

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 282**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2015 PCT/EP2015/075722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16091487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2015 E 15793746 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3230318**

54 Título: **Combinaciones de inhibidores de puntos de control inmunitarios**

30 Prioridad:

11.12.2014 GB 201422084

10.04.2015 GB 201506127

11.06.2015 JP 2015118495

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2021

73 Titular/es:

LYTIX BIOPHARMA AS (100.0%)
Tromsø Science Park P.O. Box 6447
9294 Tromsø, NO

72 Inventor/es:

EIKE, LIV MARIE;
CAMILIO, KETIL;
SVEINBJØRNSSON, BALDUR;
ZITVOGEL, LAURENCE;
YAMAZAKI, TAKAHIRO;
REKDAL, ØYSTEIN y
SVENDSEN, JOHN SIGURD MJØEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 819 282 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

Combinaciones de inhibidores de puntos de control inmunitarios

5 La presente invención se refiere a péptidos o moléculas similares a péptidos, y particularmente a preparaciones combinadas de tales péptidos con un agente adicional, y a sus usos en terapia, en particular como agentes antitumorales.

10 La prevalencia del cáncer en poblaciones humanas y animales y su papel en la mortalidad significa que existe una necesidad continua de nuevos medicamentos que sean eficaces contra los tumores. La eliminación de un tumor o la reducción de su tamaño, o la reducción del número de células cancerosas que circulan en los sistemas sanguíneo o linfático, pueden resultar beneficiosas de diversas formas; en la reducción del dolor o el malestar, en la prevención de la metástasis, para facilitar una intervención quirúrgica, para prolongar la vida.

15 Las alteraciones genéticas y epigenéticas que son características de los cánceres dan como resultado antígenos que el sistema inmunitario puede reconocer y que pueden utilizarse para diferenciar entre las células tumorales y sus equivalentes sanas. En principio, esto significa que el sistema inmunitario podría ser un arma potente para el control de tumores. Sin embargo, la realidad es que el sistema inmunitario habitualmente no proporciona una respuesta fuerte frente a las células tumorales. Es de gran interés terapéutico manipular y, por lo tanto, utilizar el sistema inmunitario en la lucha contra el cáncer (Mellman *et al.* Naturaleza 2011, vol. 480, 480-489).

20 Se han realizado diversos intentos para ayudar al sistema inmunitario a combatir tumores. Uno de los primeros enfoques implicó una estimulación general del sistema inmunitario, por ejemplo, mediante la administración de bacterias (vivas o destruidas) para suscitar una respuesta inmunitaria general que también estaría dirigida contra el tumor. Esto también se llama inmunidad inespecífica.

25 Los enfoques recientes destinados específicamente a ayudar al sistema inmunitario a reconocer antígenos específicos de tumor implican la administración al sujeto de antígenos específicos de tumor, normalmente combinados con un adyuvante (una sustancia que se sabe que provoca o potencia una respuesta inmunitaria). Este enfoque precisa el aislamiento y/o la síntesis *in vitro* de antígenos, lo cual es costoso y lento. Hay casos en que no se han identificado todos los antígenos específicos del tumor, por ejemplo, en el cáncer de mama, los antígenos conocidos se encuentran en el 20-30 % del total de tumores. Por lo tanto, el uso de vacunas específicas para tumores ha tenido un éxito limitado.

30 Sigue existiendo una gran necesidad de métodos alternativos para el tratamiento de tumores y de métodos alternativos para la inhibición del crecimiento o de la formación de tumores secundarios.

35 'Vacuna contra el cáncer' es una expresión utilizada para describir agentes terapéuticos que están diseñados para estimular el sistema inmunitario del paciente contra antígenos tumorales y dar lugar a un ataque sobre las células tumorales y a una mejor respuesta del paciente. A pesar del nombre, las vacunas contra el cáncer generalmente están destinadas a generar o potenciar una respuesta inmunitaria contra un cáncer existente, en lugar de a prevenir enfermedades. De nuevo, a diferencia de las vacunas tradicionales contra agentes infecciosos, una vacuna contra el cáncer o tumor puede no precisar la administración de un antígeno tumoral, el producto administrado puede utilizar antígenos tumorales ya presentes en el cuerpo como resultado del desarrollo del tumor y servir para modificar la respuesta inmunitaria a los antígenos asociados a tumores (los AAT) existentes.

40 Se reconoce que la falta habitual de una potente respuesta inmunitaria frente a los AAT se debe a una combinación de factores. Los linfocitos T tienen un papel fundamental en la respuesta inmunitaria, la cual se inicia mediante el reconocimiento de antígenos por parte del receptor de linfocitos T (TCR), y coordinan un equilibrio entre señales coestimulantes e inhibitoras conocidas como puntos de control inmunitario (Pardoll, Nature 2012, vol. 12, 252-264). Las señales inhibitoras suprimen el sistema inmunitario, lo cual es importante para el mantenimiento de la autotolerancia y para proteger a los tejidos del daño cuando el sistema inmunitario responde a una infección patógena. Sin embargo, la inmunosupresión reduce lo que de otro modo podría ser una respuesta útil del organismo al desarrollo de tumores.

45 En los últimos años este equilibrio de la estimulación y la supresión inmunitarias mediado por linfocitos T ha dado lugar a la adopción de un principio de la inmunoterapia tumoral conocido como enfoque de 'empujar-tirar' en el que las terapias de combinación podrían utilizarse para potenciar los factores estimulantes (empujar) y reducir los factores inhibidores (empujar) de forma simultánea. Una analogía útil es la de una terapia de combinación que presiona el acelerador (empujar) y reduce el freno (tirar). (Berzofsky *et al.* Semin Oncol. junio de 2012; 39(3) 348-57).

50 Por ejemplo, las citocinas, otras moléculas estimulantes tales como CpG (que estimulan a las células dendríticas), los ligandos del receptor de tipo Toll y otros adyuvantes moleculares potencian la respuesta inmunitaria. Las interacciones coestimulantes que implican de forma directa a los linfocitos T pueden potenciarse utilizando anticuerpos agonistas para receptores, entre ellos OX40, CD28, CD27 y CD137. Todos estos son enfoques de tipo empuje para la inmunoterapia contra el cáncer.

Las terapias complementarias de tipo 'tirar' pueden bloquear o empobrecer células o moléculas inhibitoras e incluir el uso de anticuerpos antagonistas contra lo que se conoce como puntos de control inmunitario.

Los puntos de control inmunitario incluyen al antígeno de los linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4, forma siglada de *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, forma siglada de *programmed cell death protein 1*), y los anticuerpos contra estos son conocidos en la técnica; ipilimumab fue el primer anticuerpo anti punto de control inmunitario aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico y bloquea al antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) (Naidoo *et al.* British Journal of Cancer (2014) 111, 2214-2219). La proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4, también conocida como CD152, es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se expresa en la superficie de los linfocitos T auxiliares y transmite una señal inhibitora a los linfocitos T. Se conoce su secuencia genómica, Secuencia de Referencia del NCBI: NG_011502.1, así como su secuencia proteica, Secuencia de Referencia del NCBI: NP_005205.2.

Los presentes inventores han establecido que algunos péptidos conocidos por lisar las células tumorales mediante la alteración y la permeabilización de la membrana celular, también son muy eficaces para atacar orgánulos tales como las mitocondrias y los lisosomas, y pueden provocar su lisis. Esto se puede lograr a concentraciones bajas que no provocan la lisis directa de las membranas celulares, aunque a la larga se observa pérdida de la integridad de la membrana celular, incluso con la administración de dosis bajas. A dosis más altas, estas moléculas pueden provocar la lisis de la membrana celular y luego de las membranas de los orgánulos.

Los péptidos de interés son un subconjunto del grupo de péptidos comúnmente conocidos como péptidos catiónicos antimicrobianos (los PCA). Se trata de péptidos anfipáticos con carga positiva y los péptidos de este tipo se encuentran en muchas especies y forman parte del sistema inmunitario innato. El PCA Lactoferricina (LfcinB) es un péptido de 25 aminoácidos que ha demostrado tener un efecto sobre las mitocondrias (Eliassen *et al.* Int. J. Cancer (2006) 119, 493-450). Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que el péptido LTX-315, mucho más pequeño, un péptido de 9 aminoácidos (del tipo descrito en el documento WO 2010/060497), también se dirige a las mitocondrias. Esto fue inesperado debido a que este pequeño péptido actúa mucho más rápido (provocando la muerte celular después de 30 minutos de exposición) en comparación con LfcinB (que es más eficaz después de 24 horas de exposición), y el péptido pequeño actúa contra un espectro más amplio de tipos celulares, lo que sugiere un efecto directo sobre la membrana plasmática.

Esta ruptura de la membrana de los orgánulos da como resultado la liberación de agentes de los mismos, lo que tiene una potente función inmunoestimulante, tales agentes se conocen generalmente como los DAMP (forma siglada de *Damage-associated molecular pattern molecules*, moléculas de patrones moleculares asociados a daños) e incluyen al ATP, Citocromo C, secuencias de ADN CpG mitocondrial, formil péptidos mitocondriales, cathepsinas (de lisosomas) y HMGB1 (forma siglada de *high mobility-group box-1*, grupo de alta movilidad box 1) (del núcleo). La lisis de orgánulos también puede dar como resultado la liberación de antígenos específicos de tumor (los AAT) adicionales.

Esta capacidad para estimular la respuesta inmunitaria frente a tumores mediante la rotura de las membranas mitocondriales y de otros orgánulos hace que estos péptidos sean muy adecuados como agentes de "empuje" en inmunoterapias de combinación de "empujar-tirar" diseñadas para tratar y proteger contra el desarrollo de tumores. LTX-315 también se ha utilizado como adyuvante en combinación con una vacuna de lisado de células tumorales (Berge *et al.*, 2013, Cancer Research, 73, 477).

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Dip Lys, o una sal, éster o amida del mismo, para su uso en el tratamiento de un tumor mediante la coadministración con un agente inmunoterapéutico, en donde el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-CTLA-4.

En el presente documento también se divulga:

Un compuesto, preferentemente un péptido, que tiene las siguientes características:

- a) que consiste en 9 aminoácidos en una disposición lineal;
- b) de esos 9 aminoácidos, 5 son catiónicos y 4 tienen un grupo R lipófilo;
- c) al menos uno de dichos 9 aminoácidos es un aminoácido no codificado genéticamente (por ejemplo, un derivado modificado de un aminoácido codificado genéticamente); y, opcionalmente
- d) los restos lipófilo y catiónico están dispuestos de manera que no haya más de dos de cualquiera de los tipos de resto adyacentes entre sí; y, además, opcionalmente
- e) la molécula comprende dos parejas de aminoácidos catiónicos adyacentes y una o dos parejas de restos lipófilos adyacentes;

para su uso en el tratamiento de un tumor mediante la administración combinada, secuencial o separada de un inhibidor de punto de control inmunitario (IPCI).

La terapia de combinación propuesta en el presente documento puede, en determinadas realizaciones ventajosas, proporcionar un efecto sinérgico. Se han observado tales efectos sinérgicos tan sorprendentes, por ejemplo, cuando

se utiliza un anticuerpo anti-CTLA-4 (Ejemplo 11).

Los aminoácidos catiónicos, que pueden ser iguales o distintos, son preferentemente lisina o arginina, pero pueden ser histidina o cualquier aminoácido no codificado genéticamente que porte una carga positiva a pH 7,0. Los aminoácidos catiónicos no codificados genéticamente adecuados incluyen análogos de lisina, arginina e histidina, tales como homolisina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico y homoarginina, así como trimetilisina y trimetilornitina, ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico, ácido 4-amino-1-carbamimidopiperidin-4-carboxílico y 4-guanidinofenilalanina.

Los aminoácidos no codificados genéticamente incluyen derivados modificados de aminoácidos codificados genéticamente y aminoácidos naturales distintos de los 20 aminoácidos convencionales del código genético. En este contexto, un D-aminoácido, si bien no está estrictamente codificado genéticamente, no se considera un "aminoácido no codificado genéticamente", que debería ser estructuralmente, no solo estereoespecíficamente, distinto de los 20 L aminoácidos codificados genéticamente. Las moléculas de la invención pueden tener algunos o todos los aminoácidos presentes en la forma D, preferentemente, sin embargo, todos los aminoácidos están en forma L.

Los aminoácidos lipófilos (es decir, aminoácidos con un grupo R lipófilo), que pueden ser iguales o distintos, poseen todos un grupo R con al menos 7, preferentemente al menos 8 o 9, más preferentemente al menos 10 átomos distintos de hidrógeno. Un aminoácido con un grupo R lipófilo se denomina en el presente documento aminoácido lipófilo. Normalmente, el grupo R lipófilo tiene al menos uno, preferentemente dos, grupos cíclicos, que pueden estar fusionados o enlazados.

El grupo R lipófilo puede contener heteroátomos tales como O, N o S, pero normalmente no hay más de un heteroátomo, preferentemente es nitrógeno. Este grupo R preferentemente no tendrá más de 2 grupos polares, más preferentemente ninguno o uno, más preferentemente ninguno.

El triptófano es un aminoácido lipófilo preferente y las moléculas comprenden preferentemente de 1 a 3, más preferentemente 2 o 3, muy preferentemente 3 restos de triptófano. Otros aminoácidos lipófilos codificados genéticamente que pueden incorporarse son fenilalanina y tirosina.

Preferentemente, uno de los aminoácidos lipófilos es un aminoácido no codificado genéticamente. Muy preferentemente la molécula consiste en 3 aminoácidos lipófilos codificados genéticamente, 5 aminoácidos catiónicos codificados genéticamente y 1 aminoácido lipófilo no codificado genéticamente.

Cuando las moléculas incluyen un aminoácido lipófilo no codificado genéticamente (por ejemplo, un derivado de aminoácido), el grupo R de ese aminoácido preferentemente no contiene más de 35 átomos distintos de hidrógeno, más preferentemente no más de 30, muy preferentemente no más de 25 átomos distintos de hidrógeno.

Los aminoácidos no codificados genéticamente preferentes incluyen: ácido 2-amino-3-(bifenil-4-ilo)propanoico (bifenilalanina), ácido 2-amino-3,3-difenilpropanoico (difenilalanina), ácido 2-amino-3-(antracen-9-il)propanoico, ácido 2-amino-3-(naftalen-2-il)propanoico, ácido 2-amino-3-(naftalen-1-il)propanoico, ácido 2-amino-3-[1,1':4',1"-terfenil-4-il]-popiónico, ácido 2-amino-3-(2,5,7-tri-*terc*-butil-1H-indol-3-il) propanoico, ácido 2-amino-3-[1,1':3',1"-terfenil-4-il]-popiónico, ácido 2-amino-3-[1,1':2',1"-terfenil-4-il]-popiónico, ácido 2-amino-3-(4-naftalen-2-il-fenil)-popiónico, ácido 2-amino-3-(4'-butilbifenil-4-il)propanoico, ácido 2-amino-3-[1,1':3',1"-terfenil-5'-il]-popiónico y ácido 2-amino-3-(4-(2,2-difeniletil)fenil)propanoico.

Los compuestos peptídicos divulgados en el presente documento tienen una de las fórmulas I a V enumeradas a continuación, en que C representa un aminoácido catiónico como se define anteriormente y L representa un aminoácido lipófilo como se define anteriormente. Los aminoácidos están unidos covalentemente, preferentemente mediante enlaces peptídicos que dan como resultado un péptido verdadero o mediante otros ligamientos que dan como resultado un peptidomimético, siendo preferentes los péptidos. Los extremos amino o carboxilo libres de estas moléculas pueden modificarse, el extremo carboxilo se modifica preferentemente para eliminar la carga negativa, muy preferentemente, el extremo carboxilo está amidado, este grupo amida puede estar sustituido.

CCLLCCLLC (I) (SEQ ID NO: 1)
 LCCLLCCLC (II) (SEQ ID NO: 2)
 CLLCCLLCC (III) (SEQ ID NO: 3)
 CCLLCCLCC (IV) (SEQ ID NO: 4)
 CLCCLLCCL (V) (SEQ ID NO: 5)

Un peptidomimético se caracteriza normalmente por conservar la polaridad, el tamaño tridimensional y la funcionalidad (bioactividad) de su péptido equivalente, pero en el que los enlaces peptídicos se han reemplazado, a menudo por ligamientos más estables. Por 'estable' se entiende más resistente a la degradación enzimática por enzimas hidrolíticas. En general, el enlace que reemplaza al enlace amida (el sustituto del enlace amida) conserva muchas de las propiedades del enlace amida, por ejemplo, la conformación, el volumen estérico, el carácter electrostático, la posibilidad de enlaces de hidrógeno, etc. El Capítulo 14 de "Drug Design and Development", Krogsgaard, Larsen,

Liljefors y Madsen (Eds) 1996, Horwood Acad. Pub proporciona un análisis general de técnicas para el diseño y síntesis de peptidomiméticos. En el presente caso, en que la molécula reacciona con una membrana en lugar de con el sitio activo específico de una enzima, algunos de los problemas descritos sobre la imitación de forma exacta de la afinidad y la eficacia, o de la función del sustrato, no son importantes y se puede preparar fácilmente un peptidomimético basándose en una estructura peptídica o un motivo dado de los grupos funcionales necesarios. Los sustitutos de enlace amida adecuados incluyen los siguientes grupos: N-alquilación (Schmidt, R. *et al.*, Int. J. Peptide Protein Res., 1995, 46,47), amida retroinversa (Chorev, M y Goodman, M., Acc. Chem. Res, 1993, 26, 266), tioamida (Sherman D.B. y Spatola, A.F. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 433), tioéster, fosfonato, cemetileno (Hoffman, R.V. y Kim, H.O. J. Org. Chem., 1995, 60, 5107), hidroximetileno, fluorovinilo (Allmendinger, T. *et al.*, Tetrahedron Lett., 1990, 31, 7297), vinilo, metilenamino (Sasaki, Y y Abe, J. Chem. Pharm. Bull. 1997 45, 13), metilendio (Spatola, A.F., Methods Neurosci, 1993, 13, 19), alcano (Lavielle, S. *et al.*, Int. J. Peptide Protein Res., 1993, 42, 270) y sulfonamido (Luisi, G. *et al.* Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2391).

Los compuestos peptidomiméticos pueden tener 9 subunidades identificables que son aproximadamente equivalentes en tamaño y función a los 9 aminoácidos catiónicos y lipófilos. Por lo tanto, la expresión 'aminoácido' puede utilizarse convenientemente en el presente documento para hacer referencia a las subunidades equivalentes de un compuesto peptidomimético. Además, los peptidomiméticos pueden tener grupos equivalentes a los grupos R de aminoácidos y el análisis en el presente documento de grupos R adecuados y de los grupos modificadores terminales N y C se aplica, haciendo los cambios necesarios, a los compuestos de peptidomiméticos.

Como se analiza en "Drug Design and Development", Krogsgaard *et al.*, 1996, además de la sustitución de enlaces amida, los peptidomiméticos pueden implicar la sustitución de fracciones estructurales más grandes con estructuras di- o tripeptidomiméticas y, en este caso, pueden utilizarse como reemplazos de dipéptido fracciones miméticas que implican el enlace peptídico, tales como los miméticos derivados de azol. Los peptidomiméticos y, por lo tanto, las estructuras principales de peptidomiméticos en donde solo se han reemplazado los enlaces amida como se discute anteriormente son, sin embargo, preferentes.

Los peptidomiméticos adecuados incluyen péptidos reducidos en que el enlace amida se ha reducido a una metilen amina mediante tratamiento con un agente reductor, por ejemplo, borano o un reactivo de hidruro, tal como hidruro de litio y aluminio. Dicha reducción tiene la ventaja añadida de aumentar la cationicidad global de la molécula.

Otros peptidomiméticos incluyen peptoides formados, por ejemplo, mediante la síntesis en etapas de poliglicinas funcionalizadas con amida.

Algunas estructuras principales de peptidomiméticos estarán fácilmente disponibles a partir de sus precursores peptídicos, tales como péptidos que se han permetilado, Ostresh describe métodos adecuados, J.M. *et al.* en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91,11138-11142. Las condiciones fuertemente básicas favorecerán la N-metilación sobre la O-metilación y darán como resultado la metilación de algunos o todos los átomos de nitrógeno en los enlaces peptídicos y del nitrógeno N-terminal.

Las estructuras principales de peptidomiméticos preferentes incluyen poliésteres, poliaminas y derivados de los mismos, así como alcanos y alquenos sustituidos. Los peptidomiméticos preferentemente tendrán extremos N y C que pueden modificarse como se describe en el presente documento.

Los aminoácidos β y γ , así como los aminoácidos α , se incluyen dentro del término 'aminoácidos', al igual que las glicinas sustituidas en N. Los compuestos peptídicos de la invención incluyen péptidos beta y depsipéptidos.

Como se ha analizado anteriormente, los compuestos peptídicos divulgados en el presente documento incorporan al menos uno, y preferentemente un, aminoácido no codificados genéticamente. Cuando este resto se indica como L', los compuestos preferentes están representados por las siguientes fórmulas:

CCL'LCCLLC (I') (SEQ ID NO: 6)
 CCLLCCLL'C (I'') (SEQ ID NO: 7)
 CCLL'CCLLC (I''') (SEQ ID NO: 8)
 LCCLL'CCLC (II') (SEQ ID NO: 9)

Son particularmente preferentes los compuestos (preferentemente péptidos) de fórmula I y II, y de estos, son especialmente preferentes los compuestos (preferentemente péptidos) de fórmula I'.

Los siguientes péptidos presentados en la Tabla 1 son muy preferentes.

Tabla 1

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
LTX-301	10	Dip-K-K-W-W-K-K-W-K-NH ₂
LTX-302	11	W-K-K-W-Dip-K-K-W-K-NH ₂
LTX-303	12	W-K-K-W-W-K-K-Dip-K-NH ₂
LTX-304	13	<i>Bip</i> -K-K-W-W-K-K-W-K-NH ₂
LTX-305	14	W-K-K- <i>Bip</i> -W-K-K-W-K-NH ₂
LTX-306	15	w-k-k-w-dip-k-k-w-k-NH ₂
LTX-307	16	K-K-W-Dip-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-308	17	k-k-W-Dip-k-k-W-W-k-NH ₂
LTX-309	18	K-K-W-Dip-K-K-W-Dip-K-NH ₂
LTX-310	19	K-K-W- <i>Bip</i> -K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-312	20	K- <i>Bip</i> -K-K-W-W-K-K-W-NH ₂
LTX-313	21	K-K- <i>Bip</i> -W-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-314	22	K-K-W-W-K-K-Dip-W-K-NH ₂
LTX-315	23	K-K-W-W-K-K-W-Dip-K-NH ₂
LTX-316	24	K-W-Dip-K-K-W-W-K-K-NH ₂
LTX-317	25	K-K-W-W-K-W-Dip-K-K-NH ₂
LTX-318	26	Orn-Orn-W-Dip-Orn-Orn-W-W-Orn-NH ₂
LTX-319	27	Dap-Dap-W-Dip-Dap-Dap-W-W-Dap-NH ₂
LTX-320	28	R-R-W-Dip-R-R-W-W-R-NH ₂
LTX-321	29	K-W-W-K-K-Dip-W-K-K-NH ₂
LTX-323	30	K-Dip-K-K-W-W-K-K-W-NH ₂
LTX-324	31	K-K-Dip-W-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-325	32	k-w-w-k-k-dip-w-k-k-NH ₂
LTX-326	33	R-R- <i>Bip</i> -W-R-R-W-W-R-NH ₂
LTX-327	34	R-R-Dip-W-R-R-W-W-R-NH ₂
LTX-329	35	k-k-bip-w-k-k-w-w-k-NH ₂
LTX-331	36	k-k- <i>Bip</i> -w-k-k-w-w-k-NH ₂
LTX-332	37	K-K-bip-W-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-333	38	Dab-Dab-W-Dip-Dab-Dab-W-W-Dab-NH ₂
LTX-334	39	K-K-W-1-Nal-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-335	40	K-K-W-2-Nal-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-336	41	K-K-W-Ath-K-K-W-W-K-NH ₂
LTX-338	42	K-K-W-Phe(4-4' <i>Bip</i>)-K-K-W-W-K-NH ₂

En que:

- 5 • el código convencional de una sola letra se utiliza para los aminoácidos codificados genéticamente
- la minúscula indica D aminoácidos
- Dip es difenilalanina
- Bip es bifenilalanina
- Orn es ornitina
- 10 • Dap es ácido 2,3-diaminopropiónico
- Dab es ácido 2,4-diaminobutírico
- 1-Nal es 1-naftilalanina
- 2-Nal es 2-naftilalanina
- Ath es ácido 2-amino-3-(antracen-9-il)propanoico
- 15 • Phe(4,4'*Bip*) es ácido 2-amino-3-[1,1':4',1"-terfenil-4-il]propiónico

El compuesto LTX-315 es muy preferente.

Todas las moléculas descritas en el presente documento pueden estar en forma de sal, éster o amida.

- 20 Las moléculas son preferentemente péptidos y preferentemente tienen un extremo C modificado, en particular amidado. Los péptidos amidados pueden estar ellos mismos en forma de sal y se prefieren las formas de acetato. Las sales fisiológicamente aceptables adecuadas son bien conocidas en la técnica e incluyen sales de ácidos inorgánicos

u orgánicos, e incluyen trifluoroacetato así como acetato, y sales formadas con HCl.

Los compuestos peptídicos descritos en el presente documento son de naturaleza anfipática, su estructura de 2^{ria}, que puede o no tender a la formación de una hélice α , proporciona una molécula anfipática en condiciones fisiológicas.

Las terapias de combinación definidas en el presente documento son para el tratamiento de tumores, en particular tumores sólidos y, por lo tanto, para el tratamiento del cáncer.

Los compuestos peptídicos divulgados en el presente documento desestabilizan y/o permeabilizan las membranas de los orgánulos de células tumorales, por ejemplo, las mitocondrias, el núcleo o lisosomas, en particular las mitocondrias.

Por 'desestabilizante' se entiende una perturbación de la configuración normal de la bicapa lipídica que incluye, pero sin limitación, el adelgazamiento de la membrana, el aumento de la permeabilidad de la membrana al agua, iones o metabolitos, etc.

Los puntos de control inmunitario son conocidos en la técnica (Naidoo *et al.* y Pardoll *et al.*, citado anteriormente) y la expresión se entiende bien en el contexto de la terapia del cáncer. Los más conocidos son CTLA-4, PD-1 y su ligando PDL-1 (forma siglada de *programmed cell death protein 1 ligand*, ligando de proteína de muerte celular programada 1). Otros incluyen TIM-3, KIR, LAG-3, VISTA, BTLA. Los inhibidores de puntos de control inmunitarios inhiben su función inmunosupresora normal, por ejemplo, regulando a la baja la expresión de las moléculas de control o uniéndose a las mismas y bloqueando las interacciones receptor/ligando normales. Así como los puntos de control inmunitario frenan la respuesta del sistema inmunitario frente a un antígeno, un inhibidor de los mismos reduce este efecto inmunosupresor y potencia la respuesta inmunitaria. Los inhibidores de puntos de control inmunitarios se conocen en la técnica y son preferentes los anticuerpos anti-puntos de control inmunitarios, tales como anticuerpos anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab y tremelimumab), anticuerpos anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab, lambrolozumab, pidilizumab y RG7446 (Roche)), y anticuerpos anti-PDL-1 (por ejemplo, BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb), MPDL3280A (Genentech), MSB0010718C (EMD-Serono) y MEDI4736 (AstraZeneca)).

Por lo tanto, los IPCI preferentes son anticuerpos que se unen a una molécula de punto de control inmunitario específica, ya sea que esa molécula de punto de control inmunitario sea en sí misma un receptor o un ligando del mismo. Las moléculas de punto de control inmunitario preferentes se enumeran anteriormente. Los receptores que forman parte de un punto de control inmunitario se encuentran normalmente en la superficie de los linfocitos T.

Con el conocimiento de una diana de punto de control inmunitario, un experto en la materia puede desarrollar un inhibidor del mismo. Los inhibidores pueden seleccionarse de proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, moléculas inorgánicas pequeñas, moléculas orgánicas pequeñas que no son ácidos nucleicos o ácidos nucleicos tales como ácidos nucleicos antisentido, moléculas de ARN de interferencia pequeñas (ARNip) u oligonucleótidos. Por lo tanto, el inhibidor puede actuar para regular a la baja la expresión de una molécula de punto de control inmunitario. El inhibidor puede ser, por ejemplo, una versión modificada del ligando natural (por ejemplo, para CTLA-4, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2)), tal como una versión truncada de uno de los ligandos. Pueden ser de origen natural, recombinantes o sintéticos.

Preferentemente, el inhibidor es un anticuerpo, un ligando modificado o una molécula de ácido nucleico antisentido tal como un ARNip diseñado para inhibir una molécula de punto de control inmunitario particular. Preferentemente, el ARNip es capaz de prevenir o impedir la traducción del punto de control inmunitario, impidiendo de este modo la expresión de la proteína. Dado que se conoce la secuencia genómica de muchos puntos de control inmunitario, el experto en la materia será capaz de utilizar métodos de rutinarios para diseñar moléculas de ácido nucleico antisentido inhibidoras adecuadas.

Los inhibidores de CTLA-4, PD-1 y PD-L1 son preferentes, y son particularmente preferentes los anticuerpos contra los mismos. Dichos anticuerpos se conocen como anticuerpos bloqueantes de puntos de control inmunitario y pueden fortalecer la respuesta inmunitaria antitumoral.

En el presente documento se divulgan métodos para el tratamiento de un tumor y un método para el tratamiento de células tumorales. La terapia de combinación debería ser eficaz para destruir todas o una proporción de las células diana tumorales, o para prevenir o reducir su tasa de multiplicación, o para inhibir la metástasis o para disminuir de otra manera el efecto dañino del tumor en el paciente. El médico o el paciente deben observar una mejoría en uno o más de los parámetros o síntomas asociados con el tumor. La administración también puede ser profiláctica y esto está abarcado por el término "tratamiento". El paciente será normalmente un paciente humano, pero también se pueden tratar animales no humanos, tales como animales domésticos o de ganado.

Las dianas de cáncer incluyen melanomas, sarcomas, linfomas, leucemias, neuroblastomas y glioblastomas (por ejemplo, de cerebro), carcinomas y adenocarcinomas. Los cánceres de mama, colon, vejiga, riñón, hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), pulmón, ovario, páncreas, próstata y piel) son dianas preferentes. Los cánceres de cabeza y cuello también son dianas preferentes. Los melanomas, sarcomas y linfomas son dianas preferentes. Los tumores para tratamiento son normalmente tumores sólidos y pueden ser lesiones metastásicas accesibles para la

inyección transdérmica.

Los péptidos pueden sintetizarse de cualquier forma conveniente. Generalmente, los grupos reactivos presentes (por ejemplo, amino, tiol y/o carboxilo) estarán protegidos durante toda la síntesis. La etapa final de la síntesis será, por lo tanto, la desprotección de un derivado protegido de la invención. Al construir el péptido, en principio se puede comenzar en el extremo C o en el extremo N, aunque es preferente el procedimiento de inicio en el extremo C. Los métodos de síntesis peptídica son bien conocidos en la técnica, pero para la presente invención puede ser particularmente conveniente llevar a cabo la síntesis en un soporte de fase sólida, siendo dichos soportes bien conocidos en la técnica. Se conoce una amplia variedad de grupos protectores para aminoácidos que se utilizan en la síntesis de péptidos.

Las referencias y técnicas para sintetizar compuestos peptidomiméticos y las otras moléculas bioactivas de la invención se describen en el presente documento y son bien conocidas en la técnica.

Si bien es posible que los compuestos peptídicos (incluidas las sales, ésteres o amidas de los mismos) se administren como compuestos puros, es preferente presentarlos como formulaciones farmacéuticas, por ejemplo, incorporando uno o más diluyentes, transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los agentes activos de acuerdo con la invención pueden presentarse, por ejemplo, en una forma adecuada para administración oral, tópica, nasal, parenteral, intravenosa, intratumoral, rectal o regional (por ejemplo, perfusión aislada de extremidades). Salvo que se indique otra cosa, la administración es normalmente por vía parenteral, preferentemente por inyección por vía subcutánea, vía intramuscular, vía intracapsular, vía intraespinal, vía intraperitoneal, vía intratumoral, vía transdérmica o vía intravenosa. Para el compuesto peptídico, la administración es preferentemente intratumoral. Son particularmente preferentes las inyecciones intratumorales del compuesto peptídico de la invención, una vez al día durante varios días consecutivos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, preferentemente en 2-4 días consecutivos o a intervalos de 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, por ejemplo, 2-4 veces a intervalos de 5, 6, 7, 8 o 9 días.

Para el inhibidor de punto de control, la administración es preferentemente intravenosa o intralesional.

El compuesto peptídico puede administrarse con o después del inhibidor de punto de control inmunitario, como se ha demostrado que es eficaz con respecto a los anticuerpos anti-PD1 y anti-CTLA4. Como alternativa, el compuesto peptídico puede administrarse con o antes del inhibidor de punto de control inmunitario, como se ha demostrado que es eficaz con respecto a los anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-L1. Preferentemente, hay múltiples administraciones. El sistema inmunitario se estimula preferentemente conforme avanza el tiempo. Por ejemplo, las administraciones del compuesto peptídico y/o del inhibidor de punto de control se pueden llevar a cabo en el transcurso de ocho meses, preferentemente de cuatro meses, más preferentemente de dos meses; en tales regímenes, la administración es preferentemente semanal. Por lo tanto, puede haber de 2 a 40, preferentemente de 3 a 30, por ejemplo, de 6 a 30 o de 6 a 20 administraciones.

Los compuestos activos definidos en el presente documento pueden presentarse en las formas de administración farmacológica convencionales, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, aerosoles nasales, soluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formas de liberación sostenida. Para la preparación de estas formas se pueden emplear excipientes farmacéuticos convencionales, así como los métodos habituales de producción. Son preferentes las soluciones simples.

Además, se pueden utilizar sistemas transportadores específicos de órganos.

Las soluciones de inyección pueden, por ejemplo, producirse de manera convencional, tal como mediante la adición de agentes conservantes, tales como p-hidroxibenzoatos o estabilizantes, tales como EDTA. A continuación, las soluciones se rellenan en viales o ampollas para inyección.

Las formulaciones preferentes son aquellas en que las moléculas están en solución salina. Siendo tales formulaciones adecuadas para su uso en métodos de administración preferentes, especialmente administración local, es decir, intratumoral, por ejemplo, mediante inyección.

Salvo que se indique otra cosa, las unidades de dosificación que contienen las moléculas peptídicas contienen preferentemente 0,1-10 mg, por ejemplo 1-5 mg. La formulación puede comprender adicionalmente otros principios activos, entre ellos otros agentes citotóxicos tales como otros péptidos antitumorales. Otros principios activos pueden incluir distintos tipos de citocinas, por ejemplo, IFN- γ , TNF, CSF y factores de crecimiento, inmunomoduladores, quimioterápicos, por ejemplo cisplatino, o anticuerpos o vacunas contra el cáncer.

En el presente documento también se divulga el uso de un compuesto peptídico como se define anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor, en donde dicho compuesto peptídico se coadministra con un inhibidor de punto de control como se define anteriormente.

Preferentemente, el medicamento es para el tratamiento de tumores resistentes a múltiples fármacos (RMF).

En el presente documento también se divulga un envase o composición farmacéutica que comprende:

- 5 (i) un compuesto peptídico como se define en el presente documento; y
- (ii) un inhibidor de punto de control como se describe en el presente documento.

10 Con los envases farmacéuticos, los componentes pueden ser para la administración por separado. Como es obvio, el envase farmacéutico también puede comprender instrucciones de administración. El envase y la composición son para su uso en el tratamiento de un tumor.

15 En el presente documento también se divulga un método de tratamiento de un tumor, que comprende la etapa de administrar un compuesto peptídico como se define en el presente documento y un inhibidor de punto de control como se describe en el presente documento, juntos en cantidades farmacéuticamente eficaces, a un paciente que lo necesite.

20 Como se ha analizado anteriormente, los compuestos peptídicos desvelados en el presente documento pueden desestabilizar las membranas mitocondriales y provocar la liberación de los DAMP y de material antigénico. Esto puede tener un potente efecto positivo sobre la respuesta del sistema inmunitario frente a células cancerosas.

25 En determinados tratamientos contra el cáncer, la respuesta inmunitaria es de primordial importancia, por ejemplo, para tratar tumores secundarios no identificados, para prevenir la formación de tumores metastásicos, cuando no es posible la cirugía u otra intervención directa. Los distintos cánceres son más o menos inmunogénicos y, por lo tanto, en algunos escenarios es vital reforzar la respuesta inmunitaria frente al cáncer.

30 Por lo tanto, en el presente documento también se divulga un compuesto peptídico como se define en el presente documento para su uso en la desestabilización de una membrana mitocondrial, en donde dicho uso es en el tratamiento de un tumor. Esto puede considerarse como un uso o tratamiento inmunoterapéutico, y el tumor será normalmente canceroso. Las características y realizaciones preferentes analizadas en otro lugar en relación con las terapias de combinación se aplican, haciendo los cambios necesarios, a este aspecto.

35 En el presente documento también se divulga una composición que comprende o consiste en un compuesto peptídico de la invención y un agente inmunoterapéutico. En un aspecto adicional, el presente documento se divulga un método para el tratamiento de tumores en un paciente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto peptídico de la invención, y la administración simultánea o secuencial de una cantidad eficaz de un agente inmunoterapéutico.

40 Como alternativa a lo observado, se proporciona un compuesto peptídico que tiene la fórmula Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Dip Lys, o una sal, éster o amida del mismo, y un agente inmunoterapéutico para su uso en el tratamiento de tumores, en donde el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-CTLA-4.

45 Por "agente inmunoterapéutico" se entiende un agente que modula la respuesta inmunitaria. Preferentemente, el agente inmunoterapéutico potencia la respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos tumorales, por ejemplo, mediante la supresión (preferentemente de manera selectiva) de linfocitos Treg y/o de las CSDM y/o mediante el bloqueo del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), un receptor inhibidor expresado en linfocitos T. En todos los aspectos y realizaciones de la invención, el agente inmunoterapéutico es preferentemente un agente anti-CTLA-4.

El experto en la materia será capaz de seleccionar las dosificaciones adecuadas del agente inmunoterapéutico.

50 El agente inmunoterapéutico, por ejemplo, el inhibidor de punto de control inmunitario, tal como un agente anti-CTLA-4, se administra preferentemente antes o simultáneamente con el compuesto peptídico de la invención, es muy preferente que se administre antes de la primera administración del compuesto peptídico de la invención. Preferentemente, se administra antes del compuesto peptídico de la invención, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días antes del compuesto peptídico de la invención. Preferentemente, la primera administración peptídica es 1 o 2 días después de la última administración del IPCI. Puede haber de 1 a 8 administraciones de IPCI, por ejemplo, 2 a 4 administraciones proporcionadas con 2, 3 o 4 días de diferencia. Pueden utilizarse múltiples dosis, que pueden ser, por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días de diferencia.

60 Por ejemplo, el agente anti-CTLA-4 ipilimumab se administra normalmente una vez cada tres semanas con un total de cuatro dosis. El agente anti-PD1 nivolumab se administra normalmente cada dos semanas y el agente anti-PD1 pembrolizumab se administra normalmente cada tres semanas. Tales regímenes de dosificación son preferentes.

El anti-PD-L1 se administra preferentemente al mismo tiempo o después del compuesto peptídico.

65 En algunas realizaciones, el compuesto peptídico se administra el mismo día que la primera dosis del agente inmunoterapéutico, seguido de administraciones semanales durante cuatro a ocho semanas, por ejemplo, seis

semanas, como parte de una fase de inducción. Después, el compuesto peptídico puede, a partir de entonces, administrarse cada dos semanas como parte de una fase de mantenimiento.

La coadministración puede ser simultánea o secuencial y por la misma o distintas vías de administración, por ejemplo, oral y/o parenteral, o i.p. para el IPCI e intratumoral para el compuesto peptídico.

Se proporciona adicionalmente un producto que contiene un compuesto peptídico que tiene la fórmula Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Dip Lys y un agente inmunoterapéutico, en donde el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-CTLA-4, como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de tumores.

Los inventores también han descubierto sorprendentemente que el tratamiento de un tumor con un compuesto peptídico como se define en el presente documento junto con un agente inmunoterapéutico, puede inducir una inmunidad adaptativa contra otros tumores. Por lo tanto, los métodos, usos y productos (composiciones) anteriores pueden extenderse opcionalmente a la inducción de una inmunidad adaptativa contra otros tumores. Por lo tanto, por ejemplo, en el presente documento también se divulga un compuesto peptídico como se define en el presente documento y un agente inmunoterapéutico para su uso en el tratamiento de tumores en un paciente y la inducción de la inmunidad adaptativa contra el crecimiento, desarrollo o establecimiento de tumores en dicho paciente.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, en el presente documento se divulga un método para la inducción de la inmunidad adaptativa contra el crecimiento, desarrollo o establecimiento de tumores en un paciente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto peptídico como se define en el presente documento, y la administración simultánea o secuencial de una cantidad eficaz de un agente inmunoterapéutico.

Como alternativa a lo observado, en el presente documento se divulga un compuesto peptídico como se define en el presente documento y un agente inmunoterapéutico para su uso en la inducción de una inmunidad adaptativa contra el crecimiento, desarrollo o establecimiento de tumores.

Como alternativa a lo observado, en el presente documento se divulga el uso de un compuesto peptídico como se define en el presente documento y un agente inmunoterapéutico en la fabricación de un medicamento para su uso como vacuna contra el crecimiento, desarrollo o establecimiento de tumores.

Por lo tanto, se divulga un producto que contiene un compuesto peptídico como se define en el presente documento y un agente inmunoterapéutico como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en la inducción de una inmunidad adaptativa contra el crecimiento, desarrollo o establecimiento de tumores.

En el presente documento también se divulga un método para la vacunación de un sujeto contra el crecimiento, desarrollo o establecimiento de un tumor mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto peptídico como se define en el presente documento y de un agente inmunoterapéutico a dicho paciente. La referencia a una 'vacuna' y 'vacunación' implican un efecto profiláctico, por lo tanto, si bien puede haber un tratamiento directo beneficioso de los tumores existentes, una motivación significativa en este aspecto de la invención es la prevención o reducción del crecimiento o desarrollo de futuros tumores.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes Ejemplos y con referencia a las figuras, en las que:

La Figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de glóbulos rojos en una serie de experimentos para probar el péptido LTX-315 a concentraciones variables. El eje X muestra la concentración de péptido ($\mu\text{g/ml}$). El eje Y muestra el % de muerte celular;

La Figura 2 muestra el crecimiento tumoral en ratones reinoculados con células de linfoma de linfocitos B murino A20 en comparación con el crecimiento en los animales de control del estudio inicial. Los rombos indican los controles de los estudios primarios. Los cuadrados negros indican ratones reinoculados;

La Figura 3 muestra el crecimiento tumoral en ratones individuales reinoculados con células de linfoma de linfocitos B murino A20 que se habían tratado inicialmente con LTX-315. Los cuadrados el indican al Ratón 1. Los triángulos (base hacia abajo) indican al Ratón 2. Los triángulos (base hacia arriba) indican al Ratón 3. Los rombos el indican al Ratón 4;

La Figura 4 muestra el crecimiento tumoral en ratones reinoculados con células de carcinoma de colon murino CT26WT en comparación con el crecimiento en los animales de control. Los rombos indican los controles de los estudios primarios. Los cuadrados negros indican ratones reinoculados;

La Figura 5 muestra el crecimiento tumoral en ratones individuales reinoculados con células de carcinoma de colon murino CT26WT que se habían tratado inicialmente con LTX-315. Los cuadrados pequeños el indican al Ratón 1. Los triángulos pequeños (base hacia abajo) indican al Ratón 2. Los triángulos pequeños (base hacia arriba) indican al Ratón 3. Los rombos pequeños el indican al Ratón 4; Los círculos el indican al Ratón 5. Los cuadrados grandes el indican al Ratón 6. Los triángulos grandes (base hacia abajo) indican al Ratón 7. Los triángulos grandes (base hacia arriba) indican al Ratón 8. Los rombos grandes el indican al Ratón 9;

La Figura 6 muestra el crecimiento de linfomas de linfocitos B A20 en ratones irradiados que recibieron esplenocitos

- de ratones donantes que muestran una remisión tumoral completa después del tratamiento con LTX-315 (Grupo 1) o de ratones de control (Grupo 2) que recibieron esplenocitos de ratones donantes sin tratamiento previo. Los cuadrados indican al Grupo 1 (ratones que recibieron esplenocitos de donantes que muestran remisión completa). Los rombos indican al Grupo 2 (ratones que recibieron esplenocitos de donantes sin tratamiento previo);
- La Figura 7 muestra el efecto contra el cáncer de dos regímenes de tratamiento distintos sobre tumores A20 murinos sólidos (Grupos 1 y 2) en comparación con los controles no tratados (Grupo 3). Los triángulos negros invertidos (base hacia arriba) indican al Grupo 1 (tratamiento). Los cuadrados blancos indican el Grupo 2 (tratamiento + adyuvante). Los triángulos blancos (base hacia abajo) indican al Grupo 3 (control). El orden del tamaño tumoral (mm²) en el Día 21 es (de mayor a menor): Grupo 3, Grupo 1, Grupo 2.
- Figura 8 LTX-315 provoca una muerte celular rápida en células de melanoma humano. La cinética de destrucción de células *in vitro* de LTX-315 contra la línea celular A375 de melanoma humano medida con MTT. Para cada punto de tiempo se presentan los resultados de tres experimentos como media $\pm$ DT.
- Figura 9 LTX-315 se internaliza y se acumula cerca de las mitocondrias. Las células A375 se trataron durante 30 minutos con LTX-315 marcado con fluorescencia 1,5 μ M y se marcaron las mitocondrias y el núcleo. El péptido se internalizó y se detectó muy cerca de las mitocondrias. A: canales superpuestos, B: detalle, C: mitocondrias. D: péptido
- Figura 10 La internalización se produce solo con compuestos líticos de 9 meros tal como LTX-315 y no con el péptido simulado no lítico LTX-328. Células A375 tratadas con péptido LTX-315 o LTX-328 3 μ M durante 60 min. LTX-315 se detectó en el citoplasma, mientras que LTX-328 no se internalizó. A: 60 min de incubación con LTX-315, B: 60 min de incubación con LTX-328.
- Figura 11 El tratamiento con LTX-315 provoca cambios ultraestructurales. Imágenes MET (forma siglada de microscopía electrónica de transmisión) de células A375 tratadas con LTX-315 durante 60 minutos en comparación con células de control. A y D: células de control no tratadas, B y E: células tratadas con 3,5 μ M, C y F: células tratadas con 17 μ M. Aumento de 10 000X, A-C, 30 000, D-F, barra de escala de 5 μ m.
- Figura 12 Generación de ROS (forma siglada de *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno) en la muerte celular inducida por LTX-315. Se trataron células A375 con LTX-315 a distintas concentraciones durante 15 minutos. Después del tratamiento con el péptido, se añadió a las muestras carboxi-H2DCFDA y se analizó la fluorescencia con un lector de fluorescencia de placas. El experimento se realizó por duplicado, representando las barras la fluorescencia media $\pm$ D.T.
- Figura 13 Las células de melanoma humano tratadas con LTX-315 liberan citocromo C en el sobrenadante. La liberación de citocromo C en el sobrenadante tras el tratamiento de A375 con LTX-315, se determinó tras los puntos de tiempo designados (5, 15, 45 min) mediante un ensayo de ELISA.
- Figura 14 Después del tratamiento con LTX-315 se libera HMGB1 en el sobrenadante. Se trataron células de melanoma humano A375 con LTX-315 35 μ M (parte superior) o con LTX-328 (parte inferior), y el lisado celular (L) y el sobrenadante (S) se analizaron con transferencia de Western, y las células tratadas con LTX-315 mostraron una translocación gradual del lisado celular al sobrenadante celular. Las células de control se trataron con medio solo y después de 60 minutos no mostraron translocación.
- Figura 15 Niveles extracelulares de ATP después del tratamiento con LTX-315: Se trataron células A375 con LTX-315 a distintas concentraciones durante 5 minutos o se mantuvieron en condiciones controladas, y se analizó el sobrenadante en cuanto a la cuantificación de la secreción de ATP mediante bioluminiscencia de luciferasa. Se informan los datos cuantitativos (media $\pm$ D.T.) para un experimento representativo.
- Figura 16 LTX-315 desintegra la membrana mitocondrial. Imágenes MET de células de melanoma humano A547 tratadas con LTX-315 (10 μ g/ml) durante 60 minutos en comparación con células de control.
- Figura 17 Configuración experimental en un modelo MCA205 de sarcoma, comenzando en primer lugar con LTX-315 y reforzando con anticuerpos anti-proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o con anticuerpos anti-proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) (a). Se observa remisión tumoral con LTX-315 combinado con Ac para CTLA-4 y con LTX-315 combinado con Ac para PD-1 ((b) y (c)).
- Figura 18 Configuración experimental en un modelo de sarcoma MCA205, comenzando con anticuerpos anti-PD-1 o con anticuerpos anti-CTLA-4, y reforzando con LTX-315 (a) semanal. Se observa remisión tumoral con LTX-315 combinado con Ac para CTLA-4 y LTX-315 combinado con Ac para PD-1 ((b) y (c)).
- Figura 19 Configuración experimental en un modelo de sarcoma MCA205, comenzando con anticuerpos anti-PD-1 o con anticuerpos anti-CTLA-4, seguido de inoculaciones locales iterativas de LTX-315 (a). Se observa remisión tumoral con LTX-315 combinado con Ac para CTLA-4 y LTX-315 combinado con Ac para PD-1 ((b) y (c)).
- Figura 20 Efectos de inmunidad adaptativa de la combinación de anticuerpos anti-CTLA-4 con LTX-315 en un modelo de sarcoma MCA205. (a) Configuración experimental que muestra el momento de las administraciones. Se inoculan células MCA205 en el flanco derecho del animal el día -8 y en el flanco izquierdo del animal el día -4. Se administra anticuerpo anti-CTLA-4 s.c. en el flanco derecho los días 0 y 3, y se administra LTX315 i.t. en el flanco derecho del animal los días 4, 5 y 6. El flanco izquierdo se deja sin tratar. (b) a (f) El tratamiento de combinación en el que se administra LTX-315 i.t. a un tumor en el flanco derecho del animal induce una inmunidad adaptativa que da como resultado la remisión del tumor en el flanco izquierdo no tratado del animal. Después de la administración de anticuerpo anti-CTLA-4 en combinación con LTX-315 tuvo lugar un rechazo tumoral en 3 de 5 (60 %) de los tumores tratados (flanco derecho) y en 3 de 5 (60 %) de los tumores no tratados (flanco izquierdo). Después de

la administración de anticuerpo anti-CTLA-4 solo tuvo lugar un rechazo tumoral en 1 de 5 (20 %) de los tumores no tratados (flanco izquierdo).

Figura 21 Efectos antitumoral directo y de inmunidad adaptativa combinados y de la combinación de anticuerpos anti-PD-L1 con LTX-315 en un modelo de carcinoma mamario murino EMT-6.

En resumen, los Ejemplos siguientes muestran:

Ejemplo 1 - que LTX-315 es el más potente de los 5 compuestos analizados en un estudio de actividad citotóxica *in vitro* contra un panel de 37 líneas celulares de cáncer humano.

Ejemplo 2 - que LTX-315 es el más potente de los 5 compuestos analizados en un estudio de actividad citotóxica *in vitro* contra un panel de 10 líneas celulares de linfoma.

Ejemplo 3 - que LTX 315 tiene un valor de CE_{50} media superior a 1200 µg/ml (833 µM) contra glóbulos rojos humanos.

Ejemplo 4 - que la actividad antitumoral de LTX-315 dio como resultado una respuesta tumoral completa en 3 de 7 ratones tratados para el grupo que recibió la dosis óptima (Grupo 1), en una investigación sobre el efecto de LTX-315 a distintas cantidades de dosis sobre un linfoma de linfocitos B murino A20 en ratones.

Ejemplo 5 - que cuatro regímenes de tratamiento con LTX-315 distintos demostraron un fuerte efecto antitumoral contra tumores CT26WT murinos (resistentes a múltiples fármacos).

Ejemplo 6 - que LTX-315 tiene un amplio espectro de actividad contra diversas líneas de células de cáncer resistentes a múltiples fármacos y, de manera significativa, un efecto citotóxico mucho más débil sobre células humanas normales.

Ejemplo 7 - que la remisión tumoral completa después del tratamiento inicial de tumores sólidos murinos con LTX-315 dio como resultado una forma de protección endógena a largo plazo contra el crecimiento de los mismos tumores después de la reinoculación.

Ejemplo 8 - que el tratamiento con LTX-315 puede conferir protección a largo plazo contra tumores específicos al suscitar una respuesta inmunitaria.

Ejemplo 9 - que se ha inducido una respuesta inmunitaria anti-células A20 mediante la inyección del cóctel de LTX-315 y células A20 lisadas.

Ejemplo 10 - que el tratamiento con LTX-315 induce rasgos distintivos de muerte celular inmunogénica por distorsión de las mitocondrias en células de melanoma humano.

Ejemplo 11- que el tratamiento con LTX-315 en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 provocó una remisión tumoral completa y duradera en una alta proporción de sujetos de prueba e indujo una respuesta inmunitaria adaptativa. El anticuerpo anti-PD-1 también mostró la capacidad de actuar en combinación con LTX-315 para inhibir el crecimiento tumoral.

Ejemplo 12- que el tratamiento con LTX-315 en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 provocó una remisión tumoral en una alta proporción de sujetos de prueba e indujo una respuesta inmunitaria adaptativa.

Ejemplo 1

Estudio de la actividad citotóxica *in vitro* de 5 compuestos de prueba contra un panel de 37 líneas celulares de cáncer humano

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

- Determinar las concentraciones de cinco compuestos nuevos para obtener una inhibición del 50 % de la proliferación (CI_{50}) contra un panel de 37 líneas celulares de cáncer humano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sustancias de prueba

2.1.1. Sustancias de prueba

- Sustancias de prueba, LTX-302, LTX-313, LTX-315, LTX-320 y LTX-329 (véase la Tabla 1), proporcionados en forma de polvo.

2.1.2. Control positivo

- Como control positivo se utilizó Triton X-100, suministrado por *Oncodesign* (Dijon, Francia) de Sigma (Saint Quentin Fallavier, Francia).

2.1.3. Vehículo farmacológico y condiciones de almacenamiento

- Los compuestos se almacenaron a 4 °C. El polvo se disolvió primer lugar en medio de cultivo sin suero (RPMI 1640, Lonza, Verviers, Bélgica) y se diluyó adicionalmente utilizando medio de cultivo sin suero para alcanzar las diluciones adecuadas. La solución madre no se almacenó y se preparó fresca el día del experimento.

- Se obtuvo Triton X-100 al 1 % (concentración final) mediante dilución con medio de cultivo.

2.2. Líneas de células tumorales y condiciones de cultivo

5 2.2.1. Líneas de células tumorales

Las líneas de células de cáncer y los medios de cultivo se adquirieron en y fueron proporcionados por *Oncodesign*. Los detalles de las líneas celulares se presentan a continuación en la Tabla 1.

10

Tabla 1

Líneas celulares	Origen	Fuente
SANGRE		
CCRF-CEM	leucemia linfoblástica aguda, linfocitos T	Pharmacell ^a
CCRF-CEM/VLB	leucemia linfoblástica aguda, linfocitos T	Pharmacell
HL-60	leucemia promielocítica aguda, AML, diferenciación pluripotente	ATCC ^b
HL-60/ADR	leucemia promielocítica aguda, LMA	Pharmacell
K-562	leucemia mieloide crónica, metástasis con derrame pleural	ATCC
K-562/Gleevec	leucemia mieloide crónica, metástasis con derrame pleural	Oncodesign
RPMI 8226	mieloma, linfocitos B, de tipo IgI	Pharmacell
CEREBRO		
SH-SY5Y	neuroblastoma, metástasis de médula ósea	ATCC
SK-N-AS	neuroblastoma, metástasis de médula ósea	ATCC
U-87 MG	glioblastoma, astrocitoma	ATCC
MAMA		
MCF-7	carcinoma ductal invasivo, metástasis con derrame pleural	Pharmacell
MCF7/mdr	adenocarcinoma, metástasis con derrame pleural	Pharmacell
MDA-MB-231	carcinoma ductal invasivo, metástasis con derrame pleural	Pharmacell
MDA-MB-435S	carcinoma ductal invasivo, metástasis con derrame pleural	ATCC
T-47D	carcinoma ductal invasivo, metástasis con derrame pleural	ATCC
COLON		
COLO 205	adenocarcinoma colorrectal, metástasis con ascitis	ATCC
HCT 116	carcinoma colorrectal	ATCC
HCT-15	adenocarcinoma colorrectal	ATCC
HT-29	adenocarcinoma colorrectal	ATCC
ENDOTELIO		
HUV-EC-C	normal	ATCC
RIÑÓN		
786-0	adenocarcinoma de células renales	ATCC
A-498	carcinoma	ATCC
HÍGADO		
Hep G2	carcinoma hepatocelular	ATCC
SK-HEP-1	adenocarcinoma, metástasis con ascitis	ATCC
PULMÓN		
A549	carcinoma	Pharmacell
Calu-6	carcinoma anaplásico	ATCC
NCI-H460	carcinoma, metástasis con derrame pleural	ATCC
OVARIO		
IGROV-1	carcinoma	Pharmacell
IGROV-1/CDDP	carcinoma	Pharmacell
NIH:OVCA-3	adenocarcinoma, metástasis con ascitis	Pharmacell
SK-OV-3	adenocarcinoma, metástasis con ascitis	Pharmacell
PÁNCREAS		
BxPC-3	adenocarcinoma	ATCC
PANC-1	carcinoma	ATCC
PRÓSTATA		
DU 145	carcinoma, metástasis cerebral	Pharmacell
PC-3	adenocarcinoma, metástasis ósea	ATCC

(continuación)

Líneas celulares	Origen	Fuente
PIEL		
A-431	carcinoma epidermoide	ATCC
Malme-3M	melanoma maligno	ATCC
SK-MEL-2	melanoma maligno, metástasis cutánea	ATCC
^a - Pharmacell, París		
^b -ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.		

2.2.2. Condiciones de cultivo

se cultivaron células tumorales como monocapas adherentes o como suspensiones a 37 °C en una atmósfera humidificada (CO₂ al 5 %, aire al 95 %). El medio de cultivo fue RPMI 1640 que contenía L-glutamina 2 mM (Lonza, Bélgica) y complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS, Lonza). Para su uso experimental, las células adherentes se desprendieron del matraz de cultivo mediante un tratamiento de 5 minutos con tripsina-versene (Lonza), se diluyeron en medio de Hanks sin calcio ni magnesio (Lonza) y se neutralizó mediante la adición de medio de cultivo completo. Las células se contaron en un hemocitómetro y se evaluó su viabilidad mediante exclusión de azul tripán al 0,25 %.

Se realizó una detección de micoplasma utilizando el kit de detección MycoAlert (RTM) Mycoplasma Detection Kit (Lonza), en conformidad con las instrucciones del fabricante. Todas las células analizadas resultaron negativas para la contaminación por micoplasma.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

3.1. Amplificación y siembra de líneas celulares

Las células tumorales se sembraron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Nunc, Dutscher, Brumath, Francia) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas antes del tratamiento en 190 µl de medio de cultivo sin fármaco, complementado o no con SFB al 10 %, respectivamente para las líneas celulares adherentes o en suspensión.

Las densidades de implantación para cada línea celular se resumen a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2

Líneas celulares	Densidades de implantación (células/pocillo)	Líneas celulares	Densidades de implantación (células/pocillo)
CCRF-CEM	25.000	HUV-EC-C	20.000
CCRF-CEM/VLB	25.000	786-0	15.000
HL-60	20.000	A-498	15.000
HL-60/ADR	20.000	Hep G2	15.000
K-562	20.000	SK-HEP-1	15.000
K-562/IMR	20.000	A549	15.000
RPMI 8226	20.000	Calu-6	15.000
SH-SY5Y	20.000	NCI-H460	15.000
SK-N-AS	15.000	IGROV-1	15.000
U-87 MG	15.000	IGROV-1/CDDP	15.000
MCF-7	20.000	NIH:OVCA-3	15.000
MCF7/mdr	20.000	SK-OV-3	15.000
MDA-MB-231	15.000	BxPC-3	15.000
MDA-MB-435S	20.000	PANC-1	15.000
T-47D	15.000	DU 145	15.000
COLO 205	15.000	PC-3	15.000
HCT 116	15.000	A-431	15.000
HCT-15	15.000	Malme-3M	15.000
HT-29	20.000	SK-MEL-2	15.000

3.2. Determinación de la CI₅₀

Antes del tratamiento las líneas celulares adherentes se lavaron una vez con 200 µl de medio de cultivo sin SFB. Las células tumorales se incubaron durante 4 horas con 10 concentraciones de los compuestos en una etapa de dilución 1/4 con una dosis máxima de 400 µM (intervalo de 4×10^{-4} a 4×10^{-10} M), con Triton X-100 al 1 % (concentración final)

como control positivo y medio de cultivo sin SFB como control negativo. Las células (190 µl) se incubaron en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo sin SFB que contenía las sustancias de prueba a 37 °C en CO₂ al 5 %.

Se realizaron tres experimentos independientes, analizándose cada concentración por cuadruplicado. Las células de control se trataron con vehículo solo. Al final de los tratamientos, se evaluó la actividad citotóxica mediante un ensayo de MTS (véase el punto 3.3.).

Las diluciones del compuesto analizado, así como la distribución en las placas que contenían células, se realizaron utilizando un sistema de manipulación de líquidos Sciclone ALH 3000 (Caliper Life Sciences SA). De acuerdo con el uso automatizado, se analizó un único intervalo de concentraciones, independientemente de las líneas celulares a analizar. El intervalo no se adaptó para cada línea celular.

3.3. Ensayo de MTS

La actividad citotóxica *in vitro* de la sustancia de prueba se reveló mediante un ensayo de MTS (BALTROP JA *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991, 1:611-614) utilizando un nuevo compuesto de tetrazolio (MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) y un reactivo de acoplamiento de electrones denominado PMS (metosulfato de fenazina). Como con el MTT, las células biorreducen el MTS para dar lugar a un producto de formazán que es directamente soluble en medio de cultivo sin procesamiento, a diferencia del MTT.

Al final del tratamiento de las células, se añadieron en cada pocillo 40 µl de una solución recién combinada filtrada de 0,22 µM de MTS (20 ml a 2 mg/ml, Ref. G1111, Lote 235897, Cad. 03/2009, Promega, Charbonnières, Francia) y PMS (1 ml a 0,92 mg/ml, Ref. P9625, Lote 065K0961, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Ref 17-513Q, Lote 6MB0152, Cambrex). Las placas de cultivo se incubaron durante 2 horas a 37 °C. La absorbancia (DO) se midió a 490 nm en cada pocillo utilizando un contador de multimarcaje VICTOR³™ 1420 (Wallac, PerkinElmer, Courtaboeuf, Francia).

4. PRESENTACIÓN DE DATOS

4.1. Determinación de la CI₅₀

- La inhibición de la proliferación (CI) de respuesta a la dosis se expresó de la siguiente manera:

$$CI = \frac{DO_{\text{pocillos expuestos a fármaco}}}{DO_{\text{pocillos sin fármaco}}} \times 100$$

Los valores de DO son la media de 4 mediciones experimentales.

- CI₅₀: concentración de fármaco para obtener un 50 % de inhibición de la proliferación celular.

Las curvas de respuesta a la dosis se representaron utilizando XLFit 3 (IDBS, Reino Unido). Los valores de la determinación de la CI₅₀ se calcularon utilizando el programa informático XLFit 3 a partir de curvas semilogarítmicas. Se generaron los valores de la determinación de la CI₅₀ individuales, así como los valores de la media de la DT.

4.2. Índice de resistencia (IR)

El índice de resistencia se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$IR_{\text{compuesto A}} = \frac{CI_{50\text{compuesto A}}(\text{Línea celular resistente})}{CI_{50\text{compuesto A}}(\text{Línea celular sensible})}$$

Se calculó el índice de resistencia para cada compuesto, para cada par de líneas celulares sensibles y resistentes. El índice de resistencia individual se calculó cuando los valores de CI₅₀ de las líneas celulares tanto sensibles como las resistentes correspondientes se determinaron dentro del mismo experimento. Además, el índice de resistencia también se calculó como la relación de los valores medios de CI₅₀ obtenidos durante tres experimentos independientes.

5. Resultados

5.1. LTX-302

Las treinta y siete líneas de células tumorales humanas analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-302, con valores de CI₅₀ que variaban de 4,83 ± 0,96 µM a 20,09 ± 4,07 µM para las líneas celulares T-47D y Hep G2, respectivamente.

El valor medio de la CI₅₀ para el compuesto LTX-302 obtenido en las 37 líneas de células tumorales fue de 12,05 ± 4,27 µM con un valor mediano de 11,70 µM. El valor medio de la CI₅₀ obtenido para la línea celular normal (HUV-EC-C) fue mayor que para cualquiera de las líneas de células tumorales.

Las líneas celulares de cáncer de pulmón y hemático fueron las más sensibles al compuesto LTX-302 (valores medianos de Cl_{50} de 7,96 μ M (n=7) y 9,02 μ M (n=3) para las líneas celulares de cáncer de pulmón y hemático, respectivamente), mientras que las líneas celulares de cáncer hepático fueron las más resistentes (valor mediado de Cl_{50} de 17,84 μ M, n=2).

La actividad del compuesto LTX-302 pareció disminuir ligeramente por la resistencia adquirida hacia la doxorubicina, como muestran los valores de IR de ambas líneas celulares HL-60/ADR y MCF-7/mdr (1,31 y 1,23 para las líneas celulares HL-60/ADR y MCF-7/mdr, respectivamente). Por el contrario, la actividad del compuesto LTX-302 pareció aumentar por resistencia adquirida hacia el cisplatino, como muestra un valor de IR de 0,33 para la línea celular IGROV-1/CDDP.

5.2. LTX-313

Las treinta y siete (37) líneas de células tumorales humanas analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-313, con valores de Cl_{50} que variaban de 4,01 $\pm$ 0,39 μ M a 18,49 $\pm$ 4,86 μ M para las líneas celulares RPMI 8226 y U-87 MG, respectivamente.

El valor medio de la Cl_{50} para el compuesto LTX-313 obtenido en las 37 líneas de células tumorales fue de 9,60 $\pm$ 3,73 μ M con un valor mediano de 8,83 μ M. El valor medio de la Cl_{50} obtenido para la línea celular normal (HUV-EC-C) fue mayor que para cualquiera de las líneas de células tumorales.

Las líneas celulares de cáncer hemático fueron las más sensibles al compuesto LTX-313 (valor mediano de Cl_{50} de 7,04 μ M, n=7), mientras que las líneas celulares de cáncer de hígado fueron las más resistentes (valor mediano de Cl_{50} de 13,71 μ M, n=2).

La actividad del compuesto LTX-313 no pareció modificarse por resistencia adquirida hacia la doxorubicina, como muestran los valores de IR de las líneas celulares CCRF-CEM/VLB, HL-60/ADR y MCF-7/mdr (0,76, 1,16 y 1,24 para las líneas celulares CCRF-CEM/VLB, HL-60/ADR y MCF-7/mdr, respectivamente). Por el contrario, la actividad del compuesto LTX-313 pareció aumentar por resistencia adquirida hacia el cisplatino, como muestra un valor de IR de 0,49 para la línea celular IGROV-1/CDDP.

5.3. LTX-315

Las treinta y siete líneas de células tumorales humanas analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-315, con valores de Cl_{50} que variaban de 1,18 $\pm$ 0,25 μ M a 7,16 $\pm$ 0,99 μ M para las líneas celulares T-47D y SK-OV-3, respectivamente.

El valor medio de la Cl_{50} para el compuesto LTX-315 obtenido en las 37 líneas de células tumorales fue de 3,63 $\pm$ 1,45 μ M con un valor mediano de 3,27 μ M. El valor medio de la Cl_{50} obtenido para la línea celular normal (HUV-EC-C) fue mayor que para cualquiera de las líneas de células tumorales.

Las líneas celulares de cáncer de mama, hemático y de pulmón fueron las más sensibles al compuesto LTX-315 (valores medianos de Cl_{50} de 2,45 μ M (n=5), 2,60 μ M (n = 7) y 2,83 μ M (n = 3) respectivamente para las líneas celulares de cáncer de mama, hemático y de pulmón), mientras que las líneas celulares de cáncer de hígado fueron las más resistentes (valor mediano de Cl_{50} de 5,86 μ M, n=2).

La actividad del compuesto LTX-315 pareció disminuir ligeramente por la resistencia adquirida hacia la doxorubicina, como muestran los valores de IR de las líneas celulares HL-60/ADR y MCF-7/mdr (1,45 y 1,12 para las líneas celulares HL-60/ADR y MCF-7/mdr, respectivamente). Por el contrario, la actividad del compuesto LTX-315 pareció aumentar por resistencia adquirida hacia el cisplatino, como muestra un valor de IR de 0,50 para la línea celular IGROV-1/CDDP.

5.4. LTX-320

Las treinta y siete líneas de células tumorales humanas analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-320, con valores de Cl_{50} que variaban de 3,46 $\pm$ 0,22 μ M a 16,64 $\pm$ 3,15 μ M para las líneas celulares T-47D y Hep G2, respectivamente.

El valor medio de la Cl_{50} para el compuesto LTX-320 obtenido en las 37 líneas de células tumorales fue de 7,58 $\pm$ 2,79 μ M con un valor mediano de 6,92 μ M. El valor medio de la Cl_{50} obtenido para la línea celular normal (HUV-EC-C) fue mayor que para cualquiera de las líneas de células tumorales.

Las líneas celulares de cáncer hemático, de mama, de riñón y de cerebro fueron las más sensibles al compuesto LTX-320 (valores medianos de Cl_{50} de 6,04 μ M (n=7), 6,60 μ M (n=5), 6,60 μ M (n=2) y 6,92 μ M (n=3) respectivamente para las líneas celulares de cáncer hemático, de mama, de riñón y de cerebro), mientras que las líneas de células de cáncer

de hígado fueron las más resistentes (valor mediano de CI_{50} de 11,46 μM , $n=2$).

La actividad del compuesto LTX-320 parecía no haberse modificado por la resistencia adquirida hacia la doxorubicina, como muestran los valores de IR de las líneas celulares HL-60/ADR y MCF-7/mdr (0,90 y 1,19 para las líneas celulares HL-60/ADR y MCF-7/mdr, respectivamente). Por el contrario, la actividad del compuesto LTX-320 pareció aumentar por resistencia adquirida hacia el cisplatino, como muestra un valor de IR de 0,49 para la línea celular IGROV-1/CDDP.

5.5. LTX-329

Las treinta y siete líneas de células tumorales humanas analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-329, con valores de CI_{50} que variaban de $2,43 \pm 0,34 \mu M$ a $16,90 \pm 1,18 \mu M$ para las líneas celulares T-47D y U-87 MG, respectivamente.

El valor medio de la CI_{50} para el compuesto LTX-329 obtenido en las 37 líneas de células tumorales fue de $8,17 \pm 3,20 \mu M$ con un valor mediano de 7,89 μM . El valor medio de la CI_{50} obtenido para la línea celular normal (HUV-EC-C) fue mayor que para cualquiera de las líneas de células tumorales.

Las líneas celulares de cáncer hemático y de mama fueron las más sensibles al compuesto LTX-329 (valores medianos de CI_{50} de 4,92 μM ($n=5$) y 5,26 μM ($n=7$) para las líneas celulares de cáncer hemático y de mama, respectivamente), mientras que las líneas celulares de cáncer de ovario fueron las más resistentes (valor mediano de CI_{50} de 13,37 μM , $n=4$).

La actividad del compuesto LTX-329 no pareció modificarse por resistencia adquirida hacia la doxorubicina, como muestran los valores de IR de las líneas celulares CCRF-CEM/VLB, HL-60/ADR y MCF-7/mdr (0,76, 0,80 y 1,07 para las líneas celulares CCRF-CEM/VLB, HL-60/ADR y MCF-7/mdr, respectivamente). Por el contrario, la actividad del compuesto LTX-329 pareció aumentar por resistencia adquirida hacia el cisplatino, como muestra un valor de IR de 0,46 para la línea celular IGROV-1/CDDP.

5.6. Comentarios generales

La línea celular de cáncer de mama T-47D es la línea celular más sensible cualquiera que sea el compuesto LTX analizado.

Las líneas celulares de cáncer hemático son el tipo histológico más sensible para los cinco compuestos analizados, estando las líneas celulares de cáncer de hígado y de ovario entre las líneas celulares más resistentes.

Los cinco compuestos analizados presentaron la mayor actividad en la línea celular IGROV-1/CDDP (resistente a cisplatino), con respecto a la línea celular parental de cáncer de ovario IGROV-1. La resistencia a la doxorubicina pareció disminuir ligeramente la actividad de los compuestos LTX.

El compuesto LTX-315 es el compuesto más potente de los cinco compuestos analizados.

6. CONCLUSIONES

> Los cinco compuestos analizados: (es decir, LTX-302, LTX-313, LTX-315, LTX-320 y LTX-329) presentaron actividad citotóxica contra 37 líneas celulares de cáncer humano analizadas, con valores de CI_{50} en el intervalo de micromolar a diez micromolar.

> El compuesto LTX-315 es el compuesto analizado más potente, con valores de CI_{50} entre 1 y 5 micromolar en las 37 líneas celulares de cáncer humano analizadas.

Ejemplo 2

Estudio de la actividad citotóxica *in vitro* de 5 compuestos de prueba contra un panel de 10 líneas celulares de linfoma

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

- Determinar las concentraciones de cinco compuestos nuevos para obtener una inhibición del 50 % de la proliferación (CI_{50}) contra un panel de 10 líneas celulares de linfoma.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sustancias de prueba

2.1.1. Sustancias de prueba

- Sustancias de prueba, LTX-302, LTX-313, LTX-315, LTX-320 y LTX-329 (véase la Tabla 1), proporcionados en forma de polvo.

5 2.1.2. Control positivo

- Como control positivo se utilizó Triton X-100, suministrado por *Oncodesign* (Dijon, Francia), de Sigma (Saint Quentin Fallavier, Francia).

10 2.1.3. Vehículo farmacológico y condición de almacenamiento

- Los compuestos se almacenaron a 4 °C. El polvo se disolvió primer lugar en medio de cultivo sin suero (RPMI 1640, Lonza, Verviers, Bélgica) y se diluyó adicionalmente utilizando medio de cultivo sin suero para alcanzar las diluciones adecuadas. La solución madre no se almacenó y se preparó fresca el día del experimento.
- Se obtuvo Triton X-100 al 1 % (concentración final) mediante dilución con medio de cultivo.

2.2. Líneas de células tumorales y condiciones de cultivo

20 2.2.1. Líneas de células tumorales

Las líneas de células de cáncer y los medios de cultivo se adquirieron en y fueron proporcionados por *Oncodesign*. Los detalles de las líneas celulares se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

N.º	Líneas celulares	Origen	Fuente
SANGRE			
1	Daudi	linfoma de Burkitt, linfocitos B, sangre periférica	ATCC ^a
2	Hs 445	linfoma de Hodgkin, ganglio linfático	ATCC
3	KARPAS-299	Linfoma anaplásico de células grandes, linfocitos T, sangre periférica	DSMZ ^b
SANGRE			
4	Mino	Linfoma de células del manto, sangre periférica	ATCC
5	NAMALWA	linfoma de Burkitt, linfocitos B, sangre periférica	ATCC
6	Raji	linfoma de Burkitt, linfocitos B, sangre periférica	DSMZ
7	Ramos	linfoma de Burkitt, linfocitos B, sangre periférica	ATCC
8	SU-DHL-1	Linfoma anaplásico de células grandes, derrame pleural	DSMZ
9	Toledo	linfoma de linfocitos B no Hodgkin, sangre periférica	ATCC
10	U-937	Linfoma, histiocítico, diferenciación de macrófagos, derrame pleural	ATCC
^a Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia, EE.UU.			
^b Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH, Braunschweig, Alemania			

25 2.2.2. Condiciones de cultivo

Se cultivaron células tumorales como suspensiones a 37 °C en una atmósfera humidificada (CO₂ al 5 %, aire al 95 %). El medio de cultivo para cada línea celular se describe a continuación en la Tabla 4. Para su uso experimental, las células se contaron en un hemocitómetro y se evaluó su viabilidad mediante exclusión de azul tripán al 0,25 %.

Tabla 4

Líneas celulares	Medio de cultivo	Aditivos				
		SFB (%)	Glucosa (g/l)	Glutamina (mM)	NaPyr (mM)	Hepes (mM)
Daudi	RPMI 1640	10	-	2	1	10
Hs 445	RPMI 1640	20	4,5	2	1	10
KARPAS-299	RPMI 1640	20	-	2	-	-
Mino	RPMI 1640	15	4,5	2	1	10
NAMALWA	RPMI 1640	10	2,5	2	1	10
Raji	RPMI 1640	10	-	2	1	10
Ramos	RPMI 1640	10	-	2	1	10
SU-DHL-1	RPMI 1640	10	-	2	-	-
Toledo	RPMI 1640	15	4,5	2	1	10
U-937	RPMI 1640	10	-	2	-	-

Se realizó una detección de micoplasma utilizando el kit de detección MycoAlert (RTM) Mycoplasma Detection Kit (Lonza), en conformidad con las instrucciones del fabricante. Todas las células analizadas resultaron negativas para

la contaminación por micoplasma.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

3.1. Amplificación y siembra de líneas celulares

Las células tumorales se sembraron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Nunc, Dutscher, Brumath, Francia) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas antes del tratamiento en 190 µl de medio de cultivo sin fármaco ni SFB.

Las densidades de implantación para cada línea celular se resumen a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5

N.º	Líneas celulares	Densidades de implantación (células/pocillo)	N.º	Líneas celulares	Densidades de implantación (células/pocillo)
1	Daudi	25.000	6	Raji	20.000
2	Hs 445	25.000	7	Ramos	20.000
3	KARPAS-299	25.000	8	SU-DHL-1	25.000
4	Mino	25.000	9	Toledo	25.000
5	NAMALWA	15.000	10	U-937	15.000

3.2. Determinación de la CI_{50}

Las células tumorales se incubaron durante 4 horas con 10 concentraciones de los compuestos en una etapa de dilución 1/4 con una dosis máxima de 400 µM (intervalo de 4×10^{-4} a 4×10^{-10} M), con Triton X-100 al 1 % (concentración final) como control positivo y medio de cultivo sin SFB como control negativo. Las células (190 µl) se incubaron en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo sin SFB que contenía las sustancias de prueba a 37 °C en CO_2 al 5 %.

Se realizaron tres experimentos independientes, cada concentración se distribuyó por cuadruplicado. Las células de control se trataron con vehículo solo. Al final de los tratamientos, se evaluó la actividad citotóxica mediante un ensayo de MTS (véase el punto 3.3. a continuación).

Las diluciones del compuesto analizado, así como la distribución en las placas que contenían células, se realizaron utilizando un sistema de manipulación de líquidos Sciclone ALH 3000 (Caliper Life Sciences SA). De acuerdo con el uso automatizado, se analizó un único intervalo de concentraciones, independientemente de las líneas celulares a analizar. El intervalo no se adaptó para cada línea celular.

3.3. Ensayo de MTS

La actividad citotóxica *in vitro* de la sustancia de prueba se reveló mediante un ensayo de MTS (BAL TROP JA *et al.*, utilizando un nuevo compuesto de tetrazolio (MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) y un reactivo de acoplamiento de electrones denominado PMS (metosulfato de fenazina). Como con el MTT, las células biorreducen el MTS para dar lugar a un producto de formazán que es directamente soluble en medio de cultivo sin procesamiento, a diferencia del MTT.

Al final del tratamiento de las células, se añadieron en cada pocillo 40 µl de una solución recién combinada filtrada de 0,22 µM de MTS (20 ml a 2 mg/ml, Ref. G1111, Lote 235897, Cad. 03/2009, Promega, Charbonnières, Francia) y PMS (1 ml a 0,92 mg/ml, Ref. P9625, Lote 065K0961, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Ref 17-513Q, Lote 6MB0152, Cambrex). Las placas de cultivo se incubaron durante 2 horas a 37 °C. La absorbancia (DO) se midió a 490 nm en cada pocillo utilizando un contador de multimarcaje VICTOR³™ 1420 (Wallac, PerkinElmer, Courtaboeuf, Francia).

4. PRESENTACIÓN DE DATOS

4.1. Los datos de CI_{50} se determinaron como en el Ejemplo 1

5. RESULTADOS

5.1. LTX-302

Las diez líneas celulares de linfoma humano analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-302, con valores de CI_{50} que variaban de $5,30 \pm 2,02$ µM a $12,54 \pm 3,52$ µM para las líneas celulares U-937 y Raji, respectivamente.

El valor medio de la CI_{50} para el compuesto LTX-302 obtenido en las 10 líneas sensibles fue de $8,11 \pm 2,44$ µM con un valor mediano de 7,53 µM.

5.2. LTX-313

Las diez líneas celulares de linfoma humano analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-313, con valores de CI_{50} que variaban de $3,21 \pm 2,81 \mu M$ a $16,08 \pm 4,86 \mu M$ para las líneas celulares Ramos y Raji, respectivamente.

El valor medio de la CI_{50} para el compuesto LTX-313 obtenido en las 10 líneas sensibles fue de $7,05 \pm 3,91 \mu M$ con un valor mediano de $5,89 \mu M$.

5.3. LTX-315

Las diez líneas celulares de linfoma humano analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-315, con valores de CI_{50} que variaban de $1,15 \pm 0,42 \mu M$ a $4,93 \pm 1,03 \mu M$ para las líneas celulares U-937 y Raji, respectivamente.

El valor medio de la CI_{50} para el compuesto LTX-315 obtenido en las 10 líneas sensibles fue de $3,01 \pm 1,36 \mu M$ con un valor mediano de $2,93 \mu M$.

5.4. LTX-320

Las diez líneas celulares de linfoma humano analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-320, con valores de CI_{50} que variaban de $2,22 \pm ND \mu M$ a $11,26 \pm 3,42 \mu M$ para las líneas celulares Hs 445 y Raji, respectivamente.

El valor medio de la CI_{50} para el compuesto LTX-320 obtenido en las 10 líneas sensibles fue de $5,03 \pm 2,82 \mu M$ con un valor mediano de $4,84 \mu M$.

5.5. LTX-329

Las diez líneas celulares de linfoma humano analizadas fueron sensibles al compuesto LTX-329, con valores de CI_{50} que variaban de $2,46 \pm ND \mu M$ a $8,70 \pm 1,70 \mu M$ para las líneas celulares Hs 445 y Raji, respectivamente.

El valor medio de la CI_{50} para el compuesto LTX-329 obtenido en las 10 líneas sensibles fue de $5,76 \pm 2,27 \mu M$ con un valor mediano de $5,72 \mu M$.

5.6. Comentarios generales

Las líneas celulares KARPAS-299 y Raji son las líneas celulares más resistentes, cualquiera que sea el compuesto LTX analizado.

Las líneas celulares Hs 445, Ramos y U-937 son las líneas celulares más sensibles, cualquiera que sea el compuesto LTX analizado.

El compuesto LTX-315 es el compuesto más potente de los cinco compuestos analizados.

6. CONCLUSIONES

➤ Los cinco compuestos analizados: (es decir, LTX-302, LTX-313, LTX-315, LTX-320 y LTX-329) presentaron actividad citolítica contra las 10 líneas celulares de linfoma humano analizadas, con valores de CI_{50} en el intervalo de micromolar.

➤ El compuesto LTX-315 es el compuesto analizado más potente, con valores de CI_{50} entre 1 y 5 micromolar en las 10 líneas celulares de cáncer de linfoma analizadas.

Ejemplo 3

Actividad hemolítica *in vitro*

Principio de la prueba

Se midió la actividad hemolítica del péptido LTX-315 contra glóbulos rojos humanos.

Materiales y métodos

Se centrifugó sangre humana recién recogida a 1500 rpm durante 10 minutos para aislar los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos (GR) se lavaron tres veces con PBS [tampón fosfato 35 mM con NaCl 150 mM, pH 7,4] mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y se ajustaron a un hematocrito del 10 % hematocrito con PBS. Se añadieron soluciones de LTX-315 para dar lugar a un intervalo de concentraciones finales del péptido de 1200 $\mu g/ml$ a 1 $\mu g/ml$, y una concentración de GR del 1 %. La suspensión resultante se incubó con agitación durante una hora a

37 °C. Después de la incubación, la suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y se controló la hemoglobina liberada midiendo la absorbancia del sobrenadante a 405 nm. Como control negativo se utilizó PBS y se asumió que no provocaba hemólisis. Como control positivo se utilizó Triton al 0,1 % y se asumió que provocaba hemólisis total.

Sustancia de prueba: LTX-315

Sustancias de referencia: PBS (control negativo) y Triton X-100 (control positivo). Componentes de las mezclas de reacción: LTX-315, Triton X-100 al 10 %, PBS y GR (hematocrito del 10 %). Los detalles con respecto a estas sustancias se presentan a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

Concentración	PBS (ml)	GR (ml)	LTX-315 / Triton X-100 (ml)
Control neg.	630	70	-
Control pos.	623	70	7
1200	150	50	300 (madre de 2 mg/ml)
1000	200	50	250 (madre de 2 mg/ml)
500	325	50	125 (madre de 2 mg/ml)
100	595	70	35 (madre de 2 mg/ml)
50	612,5	70	17,5 (madre de 2 mg/ml)
10	560	70	70 (madre de 0,1 mg/ml)
1	623	70	7 (madre de 0,1 mg/ml)

Método de evaluación:

La hemoglobina liberada se controló midiendo la absorbancia del sobrenadante a 405 nm y el porcentaje de hemólisis se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ de hemólisis} = [(A_{405} \text{ LTX-315} - A_{405} \text{ PBS}) / (A_{405} \text{ Triton X-100 al 0,1 \%} - A_{405} \text{ PBS})] \times 100$$

Se determinó la concentración de LTX-315 correspondiente al 50 % de hemólisis (CE₅₀) a partir de una curva respuesta a la dosis.

Resultados

El valor medio de cinco experimentos distintos, con la desviación típica, se presentan a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7

Concentración de LTX-315 (mg/ml)	Muerte celular media (%)	Desviación típica	Numero de duplicados en paralelo
1200	37,7	8,1445	3
1000	38,2	9,5760	5
500	20,4	7,8613	5
100	3,6	1,1402	5
50	1,6	0,5477	5
10	0,6	0,8944	5
1	0,0	0,000	5

Los datos también están representados en la Figura 1. La Figura 1 muestra que LTX-315 tiene un valor medio de CE₅₀ superior a 1200 µg/ml (833 µM).

Ejemplo 4

Efectos farmacodinámicos con respecto a tumores de linfoma de linfocitos B murino A20 en ratones

Principio de la prueba

El objetivo del estudio fue investigar el efecto de LTX-315 a distintas cantidades de dosis en un linfoma de linfocitos B murino A20 en ratones.

Materiales y métodos

La administración tuvo lugar mediante inyección intratumoral de LTX-315 disuelto en solución salina estéril.

Se inocularon en ratones hembra, por vía subcutánea en el abdomen, 5 millones de células A20 murinas (ATCC, LGC Promochem AB, Middlesex, Inglaterra), en un volumen de 50 µl. Los ratones se dividieron en cuatro grupos (para obtener más detalles véase la Tabla 8 a continuación). El tratamiento intratumoral se inició cuando los tumores habían alcanzado el tamaño deseado de aproximadamente 5 mm de diámetro (mínimo de 20 mm²).

Se examinaron tres cantidades de dosis de LTX-315, 1 mg (Grupo 1), 0,5 mg (Grupo 2) y 0,25 mg (Grupo 3) por inyección. El volumen fue de 50 µl para todas las inyecciones. Se disolvió LTX-315 en una solución acuosa estéril de NaCl al 0,9 %. Este vehículo se utilizó como control (Grupo 4). Los cuatro grupos recibieron tres inyecciones.

Los ratones se controlaron durante el estudio midiendo los tumores y pesando a los animales de forma regular. Los ratones se siguieron hasta alcanzar la carga tumoral máxima de 125 mm², o hasta que se produjeron acontecimientos adversos graves (es decir, la formación de heridas tras tratamientos repetidos durante el periodo de seguimiento), los ratones se sacrificaron entonces. Se utilizó un calibrador para medir el tamaño tumoral y se utilizaron el pesaje y la exploración física como control de salud. Animales: Ratones Balb/c hembra sin patógenos específicos, de 6-8 semanas de vida, suministrados por Harlan (Inglaterra, RU)

Acondicionamiento de animales: Los animales se mantuvieron con comida convencional de laboratorio y agua.

El peso corporal medio, la dosis, la vía y el programa de tratamiento se proporcionan a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8

Grupo	Número de animales	Peso corporal inicial (g; media ± ET)	Tratamiento	Dosis	Vía	Programa (Día*)
1	7	20,36 ± 0,56	Una vez al día	1 µg en 50 µl (20 mg/ml)	Intra tumor	1, 2, 3
2	7	19,96 ± 0,38	Una vez al día	0,5 mg en 50 ml (10 µg/ml)	Intra tumor	1, 2, 3
3	9	20,11 ± 0,33	Una vez al día	0,25 mg en 50 ml (5 µg/ml)	Intra tumor	1, 2, 3
4	7	19,73 ± 0,40	Una vez al día	50 µl de NaCl al 0,9 % en H ₂ O	Intra tumor	1, 2, 3

* El día 1 es el primer día de tratamiento

Resultados:

El efecto antitumoral de los diversos tratamientos se presenta como tamaño tumoral medio a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

Tratamiento	Tamaño tumoral medio (mm ²) en el día 1*	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 4	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 9	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 14
Grupo 1	25,82 ± 0,80	0	3,70 ± 2,40	12,43 ± 7,87
Grupo 2	22,03 ± 0,63	0	11,41 ± 4,69	61,08 ± 23,84
Grupo 3	21,25 ± 0,64	20,60 ± 5,71	68,49 ± 12,74	69,42 ± 17,70
Grupo 4	22,79 ± 0,68	45,51 ± 5,27	57,79 ± 4,39	84,70 ± 7,35

Tamaño tumoral antes del inicio del tratamiento, en el primer día de tratamiento

El grado de respuesta tumoral en los distintos grupos de tratamiento se resume a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10

Grupo de animales	Respuesta tumoral			Recaída del tumor	Sin tumor al final del seguimiento
	sin respuesta	respuesta parcial	respuesta completa		
1	0	42,8 % (3/7)	57,2 % (4/7)	25 %	42,8 % (3/7)
2	0	71,42 %	28,57 % (2/7)	0 % (0/2)	28,57 % (2/7)
3	77,77 %	22,22 %	0 % (0/9)	NP	0
4	100 %	NP	NP	NP	NP

Discusión/Conclusiones

En el Grupo 3, que recibió la dosis más baja de LTX-315 (0,25 mg/dosis), se observa un pequeño efecto inhibidor durante los primeros días. En el Grupo 1 y el Grupo 2, que recibieron respectivamente dosis de LTX-315 de 1,0 mg/dosis y 0,5 mg/dosis, todos los animales mostraron una respuesta tumoral parcial o completa. Se descubrió que la actividad antitumoral dio como resultado una respuesta tumoral completa en 3 de 7 ratones tratados para el

Grupo que recibió la dosis óptima (Grupo 1).

En general, se observó una necrosis más fuerte y más formación de heridas en el Grupo 1 en comparación con los otros dos grupos. Excepto por la formación de heridas, no se observaron otros acontecimientos adversos o efectos tóxicos en ninguno de los grupos de animales.

En el primer período del estudio, tanto 1 mg como 0,5 mg de LTX-315 demostraron un efecto antitumoral fuerte y rápido. Sin embargo, a medida que avanza el estudio, recaen más animales del Grupo 2 que del Grupo 1.

Ejemplo 5

El efecto de LTX-315 sobre tumores de carcinoma de colon de CT26WT de murino en ratones

Materiales y métodos

La administración tiene lugar mediante inyección intratumoral de LTX-315 disuelto en solución salina estéril (NaCl al 0,9 % en agua estéril).

A cada una de un total de 40 ratones hembra se le inocularon cinco millones de células CT26WT de murino (ATCC, LGC Promochem AB, Borås, Suecia), por vía subcutánea en la superficie del abdomen en un volumen de 50 µl. Los ratones se dividieron en cinco grupos, 8 ratones en cada grupo. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño deseado de 20 mm² se inició el tratamiento mediante inyección intratumoral. El grupo uno se trató únicamente el día 1, el Grupo dos el día 1 y 2, el Grupo tres el día 1 y 3, y el Grupo cuatro el día 1, 2 y 3. Todos los tratamientos diarios fueron una única inyección de 1,0 mg de LTX-315 disueltos en 50 µl (20 mg/ml). El grupo cinco se trató con 50 µl de vehículo para LTX-315 (Grupo 5).

Los ratones se controlaron durante el estudio midiendo los tumores (calibrador digital) y pesando a los animales de forma regular. Los ratones se siguieron hasta alcanzar la carga tumoral máxima de 125 mm², o hasta que se produjeron acontecimientos adversos graves (es decir, la formación de heridas debido a inyecciones repetidas), los ratones se sacrificaron entonces. Se utilizaron el pesaje y la exploración física como control de salud.

Animales: Ratones Balb/c hembra sin patógenos específicos, de 6-8 semanas de vida, suministrados por Harlan (Inglaterra, RU)

Acondicionamiento de animales: Condiciones convencionales de animalarios. El peso corporal medio, la dosis, la vía y el programa de tratamiento se proporcionan a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11

Grupo	Número de animales	Peso corporal inicial (g; media ± ET)	Tratamiento	Dosis	Vía	Programa (Día*)
1	8	19,00 ± 1,087	Una vez al día	1 mg en 50 ml (20 mg/ml)	Intra tumor	1
2	8	19,56 ± 1,087	Una vez al día	1 mg en 50 ml (20 mg/ml)	Intra tumor	1, 2
3	8	19,41 ± 0,8999	Una vez al día	1 mg en 50 ml (20 mg/ml)	Intra tumor	1, 3
4	8	19,00 ± 0,9396	Una vez al día	1 mg en 50 ml (20 mg/ml)	Intra tumor	1, 2, 3
5 (control)	8	18,71 ± 0,7868	Una vez al día	50 µl de NaCl al 0,9 % en H ₂ O	Intra tumor	1, 2, 3

* El día 1 es el primer día de tratamiento

Resultados

El efecto antitumoral de los diversos tratamientos se presenta como tamaño tumoral medio a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12

Tratamiento	Tamaño tumoral medio (mm ²) en el día 1 *	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 6	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 10	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 17
Grupo 1	22,69 ± 0,4070	4,343 ± 2,295	7,171 ± 4,035	3,712 ± 3,712
Grupo 2	22,90 ± 1,155	1,458 ± 1,458	5,058 ± 4,014	6,644 ± 3,430
Grupo 3	21,43 ± 1,141	2,983 ± 2,983	10,85 ± 7,553	0,00 ± 0,00
Grupo 4	24,09 ± 1,653	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,308 ± 1,308
Grupo 5	21,39 ± 1,683	33,77 ± 3,168	48,37 ± 7,035	40,64 ± 19,77

* Tamaño tumoral antes del inicio del tratamiento, en el primer día de tratamiento

Se observó una respuesta tumoral completa en la gran mayoría de todos los animales tratados con LTX-315. El grado de respuesta tumoral en los distintos grupos de tratamiento se resume a continuación en la Tabla 13.

5

Tabla 13

Grupo de animales	Respuesta tumoral			Recaída del tumor	Sin tumor al final del seguimiento
	sin respuesta	respuesta parcial	respuesta completa		
1	0	27,5 %	62,5 %	20 % (1/5)	50 % (4/8)
2	0	12,5 %	87,5 %	71 % (5/7)	25 % (2/8)
3	12,5 %	0	87,5 %	29 % (2/7)	62,5 % (5/8)
4	0	0	100 % (8/8)	37,5 %	62,5 % (5/8)
5	100 % (8/8)	NP	NP	NP	NP

Discusión/Conclusiones

El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado el tamaño deseado de un mínimo de 20 mm² y los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron la carga tumoral máxima de 125 mm².

10

El final del estudio se definió como el día 17, cuando se sacrificaron seis de los ocho animales de control (Grupo 5).

Todos los regímenes de tratamiento con LTX-315 dieron como resultado un fuerte efecto anti-tumor de CT26WT.

15

De los 32 animales tratados se observó un total de 27 con una respuesta tumoral completa y cuatro con una respuesta parcial. Solo un animal (en el Grupo 3) no respondió al tratamiento. Los resultados presentados muestran que los cuatro grupos tratados tienen una respuesta tumoral global muy similar, los datos también indican que el grado de recaída del tumor fue mayor en el Grupo 2 que en los Grupos 1, 3 y 4. Además, se observó que en el Grupo 2 menos animales no tenían tumor al final del seguimiento (Figura 2).

20

Se observó necrosis y respuesta tumoral completa en todos los grupos tratados. En el Grupo 1, cuatro de ocho animales, en el Grupo 2, dos de ocho animales, en el Grupo 3, cinco de ocho animales y en el Grupo 4, cinco de los ocho animales mostraron una respuesta tumoral completa. En esta fase el tumor estaba completamente necrótico y se formó una costra en el emplazamiento del tumor.

25

En todos los grupos de tratamiento se observó necrosis en el sitio del tumor. En general, los animales de los Grupos 2, 3 y 4 mostraron más necrosis, formación de heridas y de costra que los animales del Grupo 1 que recibieron solo una inyección de LTX-315. El Grupo 4, que recibió tres inyecciones, mostró la mayor necrosis, formación de heridas y de costras. La diferencia en la necrosis entre el Grupo 1 y el Grupo 4 fue bastante grande, pero los animales que recibieron el mayor número de tratamientos parecieron adaptarse bien. No se observaron efectos tóxicos u otros efectos adversos, además del tejido necrótico local y de la formación de heridas, en ninguno de los grupos de animales tratados.

30

Los cuatro regímenes de tratamiento con LTX-315 analizados demostraron un fuerte efecto antitumoral contra tumores de CT26WT murino.

35

La cantidad de necrosis, formación de heridas y de costras fue proporcional al número de tratamientos con LTX-315 administrados.

40

Ejemplo 6

Actividad de LTX-315 contra las células cancerosas sensibles y multirresistentes, y contra células humanas normales

Las características de las líneas celulares analizadas se presentan a continuación en la Tabla 14.

45

Tabla 14

Línea celular	Susceptibilidad al fármaco	Origen	Cl ₅₀ mM
HL-60	Sensible	Leucemia promielocítica aguda	2,07
HL-60/ADR	Resistente	Leucemia promielocítica aguda	3,01
MCF-7	Sensible	Carcinoma de mama	1,94
MCF-7/mdr	Resistente	Carcinoma de mama	1,96
IGROV-1	Sensible	Carcinoma de ovario	6,37
IGROV-1/CDDP	Resistente	Carcinoma de ovario	3,19
K-562	Sensible	Leucemia mieloide crónica	3,27

(continuación)

Línea celular	Susceptibilidad al fármaco	Origen	CI50 mM
K5627/Gleevec	Resistente	Leucemia mieloide crónica	2,98
HUV-EC-C	-	Células endoteliales normales	23
GR	-	Glóbulos rojos	833

Los datos anteriores muestran el amplio espectro de actividad de LTX-315 diversas líneas de células cancerosas y, de manera significativa, un efecto citotóxico mucho más débil sobre células humanas normales.

5 Ejemplo 7

Re-exposición a linfoma de linfocitos B murino A20 y células de carcinoma de colon murino CT26WT en ratones con remisión tumoral completa.

10 Este estudio buscó investigar los efectos del crecimiento tumoral en animales que previamente habían mostrado una remisión tumoral completa después del tratamiento con LTX-315.

Métodos: Ratones Balb-c hembras (n=4), previamente tratados con LTX-315, 1 mg) o (n=9); previamente tratados con LTX-315, 0,5 o 1 mg) se reinocularon (s.c. en el área abdominal) respectivamente con células de linfoma de linfocitos B murino A20 o con células de carcinoma de colon CT26WT (5 millones), 6 semanas después del tratamiento inicial con LTX-315. Se controló el crecimiento tumoral durante hasta 36 días después de la reinoculación.

Se observó una inhibición significativa ($P < 0,006$) del crecimiento tumoral en los 4 ratones previamente tratados con LTX-315 (1 mg) en el estudio R315-03, en comparación con los animales de control (Figura 2) y, aunque se observó recaída en 1 animal, 3 semanas después se observó una remisión tumoral completa en los otros 3 ratones (Figura 3).

En 9 ratones previamente tratados con LTX-315 (0,5 o 1 mg) se observó inhibición ($P < 0,01$) del crecimiento tumoral en comparación con los animales de control (Figura 3). La reducción repentina del tamaño tumoral de la Figura 20, después del día 18, se explica por la muerte de 6 animales portadores de grandes tumores. Se observó inhibición en 7 ratones y remisión completa en 2 de los animales (Figura 5).

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la remisión tumoral completa después del tratamiento inicial de tumores sólidos murinos (linfoma de linfocitos B A20 o carcinoma de colon CT26WT murinos) con LTX-315 dio como resultado una forma de protección endógena a largo plazo contra el crecimiento de los mismos tumores después de la reinoculación. La inhibición del crecimiento tumoral fue más pronunciada en los animales portadores de tumores de linfoma de linfocitos B A20 en comparación con los animales portadores de tumores de colon de CT26WT.

Ejemplo 8

35 Efectos inmunológicos de LTX-315 en un modelo de linfoma de linfocitos B murino A20. Un estudio piloto *in vivo* de transferencia adoptiva de células de bazo.

Este estudio se llevó a cabo para investigar si la protección a largo plazo contra el crecimiento de los mismos tumores después de la reinoculación en animales observada en el estudio R315-33 podía transferirse de forma pasiva a receptores sin tratamiento previo a través de células de bazo tomadas de animales donantes tratados con LTX-315.

Se inoculaban en la superficie del abdomen diez ratones Balb/c hembra (n=32), cada uno con células A20 (5 millones en 50 μ l s.c.). Una vez que los tumores alcanzaron los 20 mm², se les inyectó LTX-315 (1 mg) por vía intratumoral, una vez al día durante 3 días, en un volumen de 50 μ l. Posteriormente se controlaron el tamaño tumoral (mm²) y el peso corporal, y se proporcionó una inyección adicional de LTX-315 si se observaba algún nuevo crecimiento tumoral. Posteriormente, los ratones que mostraban una remisión tumoral completa se sacrificaron y se utilizaron como donantes para la transferencia de esplenocitos, mientras que se utilizaron ratones donantes sin tratamiento previo como controles. Se extirparon los bazo de los ratones donantes y se aislaron las células. Se irradiaron ratones receptores sin tratamiento previo y se dividieron en 2 grupos. El Grupo 1 recibió esplenocitos aislados de ratones curados, mientras que el Grupo 2 recibió esplenocitos aislados de ratones sin tratamiento previo. Se inyectaron las células recién preparadas (20 x 10⁶ por 100 μ l) a través de la vena de la cola. Veinticuatro horas más tarde, se les inoculó a los ratones receptores 5 millones de células de linfoma de linfocito B murino A20, en la superficie del abdomen, como se describe anteriormente. Se controlaron el tamaño tumoral y el peso corporal hasta que se alcanzó una carga tumoral máxima de ~ 125 mm², o que se produjeron acontecimientos adversos graves (es decir, formación de heridas debido a la necrosis del tejido tumoral), en cuyo punto se sacrificaron los ratones.

Se observó inhibición del crecimiento tumoral en los ratones irradiados que recibieron esplenocitos aislados de los animales que habían mostrado una remisión tumoral completa después del tratamiento con LTX-315, en comparación con los animales de control que recibieron esplenocitos de donantes sin tratamiento previo (Figura 6). Además, se observó que había una diferencia en el color y la textura de los tumores en receptores de esplenocitos de ratones

tratados con LTX-315, lo que sugiere una respuesta inflamatoria inmediata.

Sobre la base de estas observaciones, los datos proporcionan pruebas de una respuesta inmunitaria adaptativa en los animales que recibieron esplenocitos de animales que previamente mostraron una remisión completa de los tumores de linfoma B A20 después del tratamiento con LTX-315. Estos datos sugieren que el tratamiento con LTX-315 puede conferir protección a largo plazo contra tumores específicos al suscitar una respuesta inmunitaria.

Ejemplo 9

El objetivo del estudio fue investigar el efecto contra el cáncer de la vacunación profiláctica con células de linfoma A20 lisadas con LTX-315 10 mg/ml:

- (i) solas; y
- (ii) en combinación con LTX-315 20 mg/ml inyectado en el sitio de la vacunación antes de la vacuna.

En total, se utilizaron dos regímenes de tratamiento distintos.

La administración se realizó mediante inyección subcutánea de LTX-315 disuelto en medio de crecimiento que contenía células de linfoma A20. El "cóctel" de células-LTX-315 se dejó durante 30 min antes de la inyección, para garantizar la lisis completa de las células cancerosas.

A los ratones del Grupo 1 ("vacuna") se les inyectó por vía subcutánea, en la superficie del abdomen, 50 µl de un "cóctel" de diez millones de células A20 murinas (ATCC, LGC Promochem AB, Borås, Suecia) y LTX-315 10 mg/ml ("lisado de A20"). Los ratones del Grupo 2 ("vacuna + adyuvante") se trataron como al Grupo 1, pero además se les administró 25 µl de LTX-315 20 mg/ml por vía subcutánea en el sitio de vacunación, 5 minutos antes de la inyección del lisado de A20. Los ratones del Grupo 3 ("control") no recibieron tratamiento.

Seis semanas después del tratamiento, se les inocularon a todos los ratones por vía subcutánea, en la superficie del abdomen, 5 millones de células de linfoma de linfocito B A20 viables, en un volumen de 50 µl.

Los ratones se controlaron durante el estudio midiendo el tamaño tumoral y pesando a los animales de forma regular. Los ratones se siguieron hasta que se alcanzó una carga tumoral máxima de ~ 130 mm², en cuyo punto se sacrificaron los ratones.

Materiales y métodos

Animales: Ratones Balb/c hembra sin patógenos específicos, de 6-8 semanas de vida, suministrados por Harlan Laboratories (Inglaterra, RU; www.harlan.com)

Acondicionamiento de animales: Condiciones convencionales de animalarios en la Universidad de Tromsø.

Sustancia de prueba: Células A20 murinas lisadas con LTX-315 (lote 1013687), y LTX-315 (lote 1013687) solo
Preparación de la sustancia de prueba: se añadieron 10x10⁶ células A20 a 50 µl de LTX-315 10 mg/ml/vehículo ("lisado de A20"). La sustancia de prueba estaba lista para su uso 30 minutos después del mezclado. El LTX-315 solo se disolvió en NaCl al 0,9 % en H₂O estéril

Vehículo: RPMI-1640 c/ L-glutamina 2 mM o NaCl al 0,9 % en H₂O estéril

Sustancias de referencia: No procede

Tratamiento de los controles: No procede

Método de evaluación: Mediciones del tamaño tumoral y control de salud mediante pesaje y exploración

Datos adicionales con respecto al método: Se utilizó un calibrador digital para medir el tamaño tumoral y se utilizaron el pesaje y la exploración física como control de salud

El peso corporal medio, la dosis, la vía y el programa de tratamiento se muestran en la Tabla 15 (a continuación).

Tabla 15

Grupo	N.º de animales	Peso corporal inicial (g; media ± ET)	Tratamiento	Cantidad de células y dosis	Vía
1	8	17,31 ± 0,3815	Una vez	10x10 ⁶ células A20 en 50 ml de LTX-315 (10 mg/ml)	Subcutánea
2	8	17,14 ± 0,4633	Una vez	0,25 ml de LTX-315 (20 mg/ml) + 10x10 ⁶ células A20 en 50 ml de LTX-315 (10 mg/ml)	Subcutánea
3	7	17,29 ± 0,3020	Sin tratar	No procede	No procede

Resultados:

El efecto contra el cáncer de los diversos tratamientos se presenta como tamaño tumoral medio a continuación en la Tabla 16 y se proporciona una presentación gráfica de los datos en la Figura 7. En la Tabla 16, el Día 1 fue el día de

la inoculación de células A20 viables seis semanas posvacunación.

Tabla 16

Tratamiento	Tamaño medio del tumor (mm ²) en el día 4	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 11	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 16	Tamaño tumor medio (mm ²) en el día 21
Grupo 1	9,515 ± 1,528	20,44 ± 6,191	36,21 ± 10,30	55,89 ± 15,27
Grupo 2	7,315 ± 2,231	17,13 ± 5,078	29,13 ± 7,903	47,16 ± 13,54
Grupo 3	10,25 ± 3,100	34,49 ± 8,298	56,04 ± 8,339	82,89 ± 14,06

5 Discusión / Conclusiones:

La inoculación de células viables de linfoma de linfocitos B A20 se llevó a cabo 6 semanas después de que se proporcionara el tratamiento (día 1), y los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron la carga tumoral máxima permitida de ~ 130 mm².

Los resultados muestran que los tumores se desarrollaron más lentamente en ambos Grupos de tratamiento con LTX-315/lisado de A20 en comparación con el Grupo de control. La mediana de la supervivencia del Grupo 1 fue de 28 días, 33 días para el Grupo 2 y 25 días para el grupo de control (Grupo 3). El aumento de la supervivencia mediana fue del 12 % para el Grupo 1 y del 35 % para el Grupo, 2 en comparación con el grupo de control (Grupo 3).

Los datos indican una supervivencia prolongada de los grupos tratados en comparación con el grupo de control no tratado. En el día 34, cuando se sacrificó el último animal del grupo de control, seguía vivo el 50 % de los animales del Grupo 2 mientras que de los animales del Grupo 1 seguía vivo el 37,5 %. El final del estudio se definió como el día 60. En este momento, un total de 3 de los 16 animales tratados tuvieron una remisión completa de un tumor inicialmente en desarrollo y no presentaban tumor. Al final del estudio, se observó que el 25 % de los animales del Grupo 1 y el 12,5 % de los animales del Grupo 2 no presentaban tumor.

Macroscópicamente hubo diferencias morfológicas entre los grupos tratados (Grupo 1 y 2) en comparación con el grupo de control no tratado (Grupo 3). Se observó que los tumores en desarrollo en los dos grupos de tratamiento eran más blancos y más duros que los tumores observados en el grupo de control. Este hallazgo, junto con la velocidad de crecimiento de los tumores más lenta, indica que mediante la vacunación con el cóctel de LTX-315 y de células A20 lisadas se indujo una respuesta inmunitaria anti-células A20.

Por lo tanto, LTX-315 puede tener un doble uso al lisar las células tumorales e inducir la liberación de señales de peligro de las células normales en el lugar de la inyección.

Ejemplo 10

En este estudio, los inventores examinaron el efecto tumoricida de LTX-315 sobre células de melanoma humano. El péptido se internalizó y se apareció asociado con las mitocondrias, conduciendo finalmente a una muerte celular lítica. El péptido LTX-315 se diseñó para tratar tumores sólidos con inyecciones intratumorales mediante un modo de acción de dos fases: el primero es el colapso del propio tumor, mientras que el segundo son las moléculas de patrones moleculares asociados a daños (las DAMP) liberadas de la célula tumoral que está muriendo, lo que puede inducir una protección inmunitaria posterior contra las recaídas y metástasis.

Material y métodos

Reactivos

LTX-315 y LTX-328 (K-A-Q-Dip-Q-K-Q-A-W-NH₂) se fabricaron bajo pedido en Bachem AG (Bubendorf, Suiza) e Innovagen (Lund, Suecia), respectivamente. LTX-315 Pacific Blue y LTX-328 Pacific Blue se compraron bajo pedido en Innovagen (Lund, Suecia) Norud (Tromsø, Noruega), respectivamente.

Cultivo de células

La línea celular A375, A375 (ECACC, 88113005) es un melanoma maligno humano obtenido del material de un paciente, y se adquirió en Public Health England (PHE Culture Collections, Porton Down, Salisbury, RU). Las células se mantuvieron como cultivos en monocapa en DMEM con alto contenido de glucosa al 4,5 % complementado con SFB al 10 % y L-glutamina al 1 %, pero no con antibióticos (medios completos). La línea celular se cultivó en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C, y se analizó periódicamente la presencia de micoplasma con MycoAlert (Lonza).

Citotoxicidad in vitro, ensayo de MTT

Se examinó el efecto citotóxico de LTX-315 utilizando el ensayo de viabilidad colorimétrico de MTT, como se describe

en Eliassen *et al.* (2002), 22(5): pág. 2703-10. Se sembraron células A375 a una concentración de 1×10^5 células/ml en un volumen de 0,1 ml en placas de 96 pocillos, y se dejaron adherir en medio de cultivo completo durante una noche. A continuación, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con medio RPMI-1650 sin suero, antes de añadir LTX-315 disuelto en RPMI sin suero a concentraciones que variaban de 2,5-300 $\mu\text{g/ml}$, y se incubó durante 5-180 minutos. Como control negativo de células se utilizaron células tratadas con RPMI sin suero, mientras que se utilizaron como control positivo células tratadas con Triton X-100 al 1 % en medio sin suero. Los resultados finales se calcularon utilizando la media de tres experimentos, cada uno con pocillos por triplicado.

Microscopia confocal

Obtención de imágenes en células vivas con células sin marcar - Se sembraron células A375 a 10.000 células/pocillo, en un medio completo, en un cubreobjetos con cámaras de 8 pocillos Nunc Lab-Tec (Sigma) prerrecubierto con fibronectina humana 25 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma), que se dejaron adherir durante una noche. Las células se lavaron dos veces con RPMI sin suero, se trataron con péptido disuelto en RPMI y se examinaron utilizando Bright en un microscopio confocal Leica TCS SP5, con un objetivo 63X/1,2 W. El microscopio estaba equipado con una cámara de incubación con control de CO_2 y temperatura.

Células fijadas, mitotracker- Se sembraron células como para obtención de imágenes de células vivas y se trataron con Mitotracker CMH2XROS (Invitrogen) a 100 nm durante 15 minutos antes del tratamiento con los péptidos. Se trataron las células con LTX-315 17 μM , solo con RPMI sin suero como control negativo. Después de 60 min de incubación, las células se analizaron utilizando un microscopio Zeiss. Todos los experimentos de obtención de imágenes confocales se llevaron a cabo posteriormente al menos dos veces, con resultados similares.

Células fijadas, péptido marcado con fluorescencia - Se sembraron células A375 subconfluentes a 8.000 células/pocillo como anteriormente, y se transfectaron el segundo día utilizando los reactivos de transfección Lipofectamine LTX con Plus (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las mitocondrias se marcaron utilizando el pDsRed2-Mito, y el núcleo se marcó utilizando el plásmido GFP-Histon2B (Imaging Platform, Universidad de Tromsø). Un día después de la transfección, las células se lavaron dos veces con RPMI sin suero y se trataron a distintas concentraciones y períodos de incubación con LTX-315 Pacific Blue o LTX-328 Pacific Blue. LTX-315 PB presentó un perfil citotóxico similar a LTX-315 no marcado, según se determinó mediante un ensayo de MTT. Las células de control se trataron con LTX-315 no marcado y también solamente con RPMI sin suero. Después de la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS y los pocillos se cubrieron con antidesvanecimiento Prolong Gold (Invitrogen). Las células se analizaron adicionalmente mediante el uso de un microscopio confocal Leica TCS SP5, con un objetivo 693, 1,2 W. Pacific Blue, GFP y Ds Red se excitaron con UV, con láseres de 488 y 561, y los canales de fluorescencia se detectaron secuencialmente utilizando los siguientes pasos de banda: UV: 420-480 nm (con atenuación), 488: 501-550 nm y 561: 576-676 nm.

Microscopía electrónica MET

Se sembraron células A375 a 1×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer durante tres días para optimizar las estructuras de la membrana en el cultivo, y al segundo día se cambió el medio. Las células se lavaron dos veces en RPMI sin suero antes de tratarlas con LTX-315 disuelto en RPMI sin suero, a 5, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$, con RPMI sin suero como control negativo. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS antes de la fijación durante 24 horas a 4 °C con formaldehído al 4 % y glutaraldehído al 1 %, en un tampón Hepes a pH 7,8. Los protocolos de deshidratación y posfijación incluyeron la incubación en ácido tánico tamponado al 5 % y la incubación en ferrocianuro reducido con osmio al 1 %. Se prepararon cortes ultrafinos y se utilizaron acetato de uranilo (5 %) y citrato de plomo de Reynolds para teñir y para el contraste. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 y se tomaron imágenes con una cámara CCD de MET de montaje lateral Olympus Morada (Olympus soft imaging solutions, GmbH, Alemania).

Medición de fluorescencia de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se adquirió un kit de ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno celular DCFDA de abcam®, y se sembraron células A375 en una placa negra de fondo transparente Costar de 96 pocillos, con 20.000 células por pocillo, incubada a 37 °C 16 horas antes del ensayo de DCFDA. Las células se lavaron una vez con 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de PBS precalentado y se incubaron con DCFDA 20 μM en una solución tampón suministrada con el kit, a 37 °C en una incubadora de cultivo celular durante 45 min, y a continuación se lavaron de nuevo con 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de una solución tampón. A continuación, las células se estimularon con 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de péptido LTX-315 disuelto en una solución tampón a concentraciones de 17 μM , durante 30 min, y como control negativo se utilizaron las células sin tratar. La intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm, en un lector de placas FLUOstar Galaxy.

Liberación del grupo de alta movilidad box 1 (HMGB1)

Se sembraron células A375 a 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos en medio completo y se dejaron adherir durante una noche. Las células se trataron con LTX-315 o LTX-328 35 μM y se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante

distintos puntos de tiempo (5, 10, 15, 30, 60 min), y los controles negativos fueron con RPMI-1650 sin suero. Se recolectaron los sobrenadantes (S) y centrifugaron a 1400 g durante cinco minutos, y se recogieron los lisados celulares (L) después de lavar con PBS dos veces y entonces se lisaron posteriormente utilizando un tampón de muestra 4X (Invitrogen, número), DTT 0,1 M (número Sigma) y agua. Los sobrenadantes se concentraron utilizando filtros centrífugos Amicon Ultra 50K (Millipore UFC505024) y se trató con ultrasonidos el lisado celular. Tanto los sobrenadantes como el lisado se hirvieron y se resolvieron en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10 % (SDS-PAGE), y a continuación se electrotransfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore). La membrana se bloqueó en leche al 5 % y se incubó con el anticuerpo para HMGB1 (ac. policlonal de conejo, abcam 18256); a continuación, la membrana se enjuagó varias veces con TBST, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (abcam ab6721), se enjuagó nuevamente con TBST y a continuación se reveló utilizando WB Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania).

Liberación de Citocromo-C

Las células A375 se sembraron como en los estudios de HMGB1 y se trataron con 35 μ M para distintos puntos de tiempo (5, 15, 45). Los sobrenadantes se recolectaron y se concentraron como en los estudios de HMGB1, y se analizaron muestras de los sobrenadantes utilizando el kit Cytochrome C-Elisa en forma sólida de 4,5 horas (R&D Systems, EE. UU., n.º DCTC0) siguiendo, la descripción del fabricante. Poco después, se analizó una muestra diluida al 50 % y se determinó la densidad óptica utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm, y esta lectura se restó después de la lectura a 540 nm. Se generó una curva patrón para cada conjunto de muestras sometidas a ensayo. Las muestras se procesaron con cuatro duplicados en paralelo, y el citocromo-c liberado en el sobrenadante se expresó en veces por encima del nivel de citocromo-c en el sobrenadante de las células no tratadas.

Liberación de ATP

Se analizó el sobrenadante de células A375 tratadas con LTX-315 utilizando un kit Enliten ATP luciferase assay (Promega, EE.UU.). A continuación, las células se sembraron como en un ensayo de ROS y se trataron con LTX-315 en distintos tiempos de incubación, de 1 a 15 minutos, con dos duplicados en paralelo, lo que luego se llevó a cabo tres veces. Los controles negativos fueron células A375 no tratadas expuestas a medio sin suero solo. Las muestras se diluyeron a 1:50 y 1:100, y se analizaron con un luminómetro Luminoscan RT de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Análisis estadístico

Todos los datos representan al menos dos experimentos independientes con al menos dos duplicados en paralelo, los cuales se expresaron como la media $\pm$ DT. Los datos de liberación de citocromo C y de liberación de ATP se compararon utilizando ANOVA unidireccional y una prueba de comparaciones múltiples, y los inventores consideraron el valor de $P < 0,05$ para indicar significación estadística.

Resultados

Efecto citotóxico de LTX-315 sobre células de melanoma

Para investigar el efecto de LTX-315 sobre células de melanoma A735 *in vitro*, los inventores determinaron los valores de CI-50 para el péptido mediante un ensayo de viabilidad celular de MTT en distintos tiempos de incubación. El valor de CI-50 fue de 30 μ M después de solo cinco minutos de incubación y progresó a 14 μ M después de 90 minutos. Una incubación adicional de hasta 180 minutos no ofreció ningún efecto adicional (Figura 8).

El tratamiento con LTX-315 provoca una rápida lisis celular

A continuación, los inventores quisieron evaluar la morfología celular de las células de melanoma A735 tratadas con LTX-315. Las células se trataron con LTX-315 a un valor de CI-50 y se examinaron mediante microscopía confocal de campo brillante. Las células tratadas presentaron un cambio rápido de una morfología epitelial normal a un colapso total de las células con una extrusión de contenido citoplasmático, lo que estuvo precedido por un redondeamiento de la célula (datos no mostrados). Estos cambios se produjeron normalmente al cabo de 15-60 minutos a un valor de CI-50, en la mayoría de las células.

LTX-315 internaliza y se dirige a las mitocondrias

Para investigar la internalización y el destino del péptido dentro de las células, LTX-315 se marcó con Pacific Blue y se incubó con células a concentraciones respectivamente de 3 μ M y 1,5 μ M. El LTX-315 marcado penetró rápidamente en la membrana plasmática y a 1,5 μ M, el péptido mostró una acumulación alrededor de las mitocondrias después de 30 minutos de incubación, pero no se detectó en el núcleo celular (Figura 9). El péptido LTX-328 de secuencia simulada no lítico marcado no demostró ninguna internalización a ninguna concentración o tiempo de incubación analizado (Figura 10).

LTX-315 induce cambios ultraestructurales en las células

Además, los inventores evaluaron los cambios ultraestructurales en las células tratadas realizando microscopía electrónica de transmisión (MET), en que las células A375 se trataron con péptidos disueltos directamente en medio o en medio solo. Un número significativo de las células tratadas con una concentración baja (3,5 μM) del péptido LTX-315 durante 60 minutos mostraron vacuolización, así como algo de alteración de la morfología mitocondrial (Figura 11). La mitocondria parecía ser menos electrodensa, mostrando también cierto grado de reorganización, con las crestas más separadas o no visibles en absoluto. El número de células necróticas en estas muestras fue inferior al 5 %. En estas concentraciones bajas, se observó vacuolización del citoplasma. Otro hallazgo común en estas muestras fueron las vacuolas ubicadas de forma periférica, que estaban revestidas con única capa de membrana que contenía un material homogéneo (Figura 11B). Cuando las células se trataron con una concentración más alta (17 μM) durante 60 min, aproximadamente el 40 % de ellas presentaba una morfología necrótica con pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Figura 11C y E). Las células que aún estaban intactas presentaban una gran heterogeneidad, desde una apariencia normal con microvellosidades hasta una apariencia redonda, estando las mitocondrias claramente afectadas. En esta concentración alta, solo el 4 % de las células examinadas presentaron vacuolización, y no fue visible condensación de cromatina en este material a ninguna concentración de péptido analizada. Estos resultados demuestran que LTX-315 destruye las células tumorales con un modo de acción lítico, mientras que las concentraciones más bajas provocan que las células experimenten cambios ultraestructurales, tales como vacuolización y una morfología mitocondrial alterada. Además, no se observaron cambios morfológicos significativos que sugirieran muerte celular apoptótica.

En un experimento distinto, la exposición de células A547 humanas (una línea celular de melanoma de ovario) a LTX-315 10 $\mu\text{g/ml}$ condujo a la desintegración de la membrana mitocondrial (Figura 16).

El tratamiento con LTX-315 conduce a la liberación extracelular de ATP

Las DAMP son moléculas que se liberan a partir de fuentes intracelulares durante el daño celular. Las DAMP pueden iniciar y perpetuar una respuesta inmunitaria mediante la unión a los Receptores de Reconocimiento de Patrones (los RRP) en las células presentadoras de antígeno (CPA). Entre los DAMP comúnmente conocidos se encuentran ATP, HMGB1, Calreticulina, Citocromo C, ADN mitocondrial y especies reactivas de oxígeno (ROS). A continuación, los inventores quisieron investigar si se liberaba ATP en el sobrenadante de las células tratadas con LTX-315. Por lo tanto, se analizó el sobrenadante de células tratadas y no tratadas utilizando un ensayo de detección de luciferasa. Como se muestra en la Figura 15, se detectó ATP en el sobrenadante tan pronto como después de 5 minutos de tratamiento con LTX-315, y la liberación era dependiente de la concentración.

El tratamiento con LTX-315 induce la liberación de citocromo C en el sobrenadante

Para evaluar si las células tratadas con LTX-315 liberaban citocromo C en el medio, se trataron células A375 con LTX-315 35 μM hasta distintos puntos de tiempo (5, 15, 45 min). El sobrenadante se analizó posteriormente utilizando un ensayo de ELISA. Las células tratadas con un valor de 35 μM tenían tres veces más citocromo-C en el sobrenadante en comparación con las células de control no tratadas. El aumento de citocromo C se detectó después de solo cinco minutos de tratamiento, y también hubo un aumento después de 15 y 45 minutos respectivamente de tratamiento con el péptido (Figura 13).

El tratamiento con LTX-315 conduce a la liberación extracelular de HMGB1

HMGB1 es una proteína nuclear de unión a cromatina que no es una histona. Una vez liberada de forma pasiva a partir de células necróticas, HMGB1 es capaz de desencadenar la maduración funcional de las células dendríticas, la estimulación de citocinas y la quimiotaxia, entre varios efectos inmunopotenciadores.

HMGB1 se encuentra normalmente en el núcleo celular y es de esperar que se encuentre en un lisado celular de células sanas, aunque no en el medio de cultivo (sobrenadante). Para evaluar la liberación de HMGB1 a partir de células tratadas con LTX-315, los inventores midieron la translocación y la HMGB1 libre desde el compartimento nuclear, en el lisado celular, hacia el sobrenadante celular.

El lisado celular y el sobrenadante celular de células de melanoma A375 tratadas con LTX-315 y con LTX-328 se analizaron utilizando una transferencia de Western. Las células se trataron con LTX-315 o con LTX-328 35 μM , detectándose una translocación gradual desde el lisado celular al sobrenadante en las células de melanoma tratadas con LTX-315, pero no en las células tratadas con el péptido de secuencia simulada LTX-328 o con solamente un medio sin suero (Figura 14).

El tratamiento con LTX-315 provoca la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de melanoma A375

Mediante un ensayo fluorométrico con CH2DCFDA se midió la generación de ROS después del tratamiento con LTX-

315. Después de 15 minutos de incubación con LTX-315 se generaron cantidades significativas de ROS, y los niveles de ROS fueron dependientes de la concentración (Figura 12).

Análisis

LTX-315 marcado con la molécula fluorescente Pacific Blue se internalizó al cabo de minutos tras la incubación con células de melanoma A375, y se distribuyó en el citoplasma (Figura 9).

A concentraciones bajas, la acumulación del péptido alrededor de las mitocondrias era evidente, mientras que, a concentraciones más altas, el péptido estaba más extendido dentro del citoplasma y se acumulaba en estructuras circulares más cercanas a la membrana celular (Figura 10). Si el péptido ataca la membrana mitocondrial, sería de esperar una disminución o incluso un colapso total del potencial de membrana mitocondrial. Una obtención de imágenes confocales de células con tinción mitocondrial dependiente del potencial de membrana Mitotracker CMXh2ROS mostró una pérdida de la señal mitocondrial poco tiempo después del tratamiento con péptido (datos no mostrados). La pérdida de la señal muestra que la interacción del péptido con las mitocondrias provoca una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que es fundamental para las funciones celulares más importantes de la mitocondria. Además, se demostró una morfología mitocondrial alterada con MET. Las células tratadas con LTX-315 durante 60 minutos tenían mitocondrias menos electrodensas, con una organización alterada de las crestas, así como la vacuolización dentro de las mitocondrias, en comparación con las células no tratadas (Figura 11). Adicionalmente, la vacuolización fue evidente en aproximadamente el 20 % de las células tratadas con LTX-315 3,5 μ M. Cuando las mitocondrias son disfuncionales, se pueden formar radicales libres de oxígeno (ROS), y mediante el uso de ensayos fluorométricos los inventores demostraron la formación de ROS al cabo de pocos minutos tras el tratamiento con péptido (Figura 12).

En este estudio, los inventores demostraron que el tratamiento con el péptido LTX-315 provoca un aumento de los niveles de ROS en las células de melanoma A375 después del tratamiento. Una explicación para estos niveles más altos de ROS después del tratamiento con péptido podría ser que el péptido entra en las células y se dirige a las mitocondrias, y las mitocondrias disfuncionales liberan entonces ROS. Mediante un ensayo de ELISA, los inventores detectaron la liberación de citocromo C en el sobrenadante de las células tratadas con péptido después de solo unos minutos de tratamiento (Figura 13). El citocromo C es una proteína mitocondrial liberada desde el espacio intermembrana hacia el citosol cuando se perturba la membrana mitocondrial externa y, al unirse al factor 1 activador de proteasa apoptótica (Apaf-1), también es parte de la cascada apoptótica que finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, si el citocromo C se encuentra en el espacio extracelular, se ha informado que actúa como un mediador proinflamatorio, activando de este así el NF- κ B e induciendo la producción de citocinas y quimiocinas. La transición de HMGB1 desde el compartimento celular al compartimento extracelular se detectó utilizando una transferencia de Western (Figura 14). Cuando la proteína nuclear HMGB1 se libera en el líquido extracelular, actúa como una DAMP y puede unirse tanto a los TLR RRP como a los receptores RAGE; la activación de estos puede conducir a una serie de respuestas inflamatorias, tales como la transcripción de citocinas proinflamatorias. Además, los inventores detectaron ATP liberado en el sobrenadante después de la incubación con péptido (Figura 15), que presentado de forma extracelular actúa como una DAMP mediante la activación de los receptores purinérgicos P2RX7 en las CD. Este receptor no solo actúa como un poro que se abre para moléculas catiónicas pequeñas y más tarde moléculas más grandes tras la unión al ATP, su activación también provoca el procesamiento y liberación de la citoquina proinflamatoria IL-1 β .

En resumen, los datos de los inventores sugieren que LTX-315 induce la muerte celular lítica en células cancerosas, no solo mediante un ataque directo a la membrana plasmática, sino también como resultado de una lesión en los orgánulos intracelulares vitales después de la internalización del péptido a concentraciones demasiado bajas para provocar una pérdida inmediata de la integridad de la membrana plasmática. Los inventores demostraron que el tratamiento con péptido provoca la liberación de varias DAMP, tales como CytC, ATP, HMGB1 y ROS. Las DAMP pueden afectar la integridad celular de las células dañadas de varias formas, pero también están asociadas con la denominada muerte celular inmunogénica. La liberación de antígenos específicos de tumor en el compartimento extracelular, junto con potentes moléculas inmunoestimulantes (las DAMP) tales como ATP, CytC y HMGB1, puede proporcionar una fuerte respuesta inmunitaria. A su vez, estos factores conducirán a la maduración y activación de las CD y otras células accesorias del sistema inmunitario adaptativo.

Ejemplo 11

La combinación de LTX-315 con un anticuerpo anti-proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o un anticuerpo anti-proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) se ensayó en un modelo de sarcoma MCA205 de ratón. Se estudiaron siete animales por grupo. Para cada estudio, se realizaron dos experimentos independientes que produjeron resultados idénticos. Se realizaron análisis estadísticos por Anova.

El anticuerpo anti-PD-1 utilizado en este estudio fue de un isotipo IgG murino. El anticuerpo anti-CTLA-4 fue de un isotipo IgG de rata. Ambos anticuerpos se adquirieron en eBioscience.

Las Figuras 17a, 18a, 19a y 20a muestran los momentos y vías de administración de LTX-315 y los anticuerpos en los diversos estudios. Por lo tanto, en el día -8 se inoculó a los ratones con células cancerosas MCA205 y se dejó que

se formaran tumores palpables. A continuación, se administró LTX-315 por vía intratumoral en los días mostrados en las Figuras y se administraron los anticuerpos anti-PD-1 o anti-CTLA-4 i.p. en los días mostrados.

Se llevó a cabo un estudio de inmunidad adaptativa utilizando la combinación de anticuerpo anti-CTLA-4 y LTX-315 de una manera similar a la analizada anteriormente.

Los resultados de estos estudios se analizan en la leyenda de las Figuras 17 a 20. Como los efectos de los anticuerpos anti-PD1 se producen en el microambiente local del tumor (el anti-CTLA-4 actúa en el tejido linfático), se predice que la combinación del compuesto peptídico con anticuerpos anti-PD1 sería más pronunciada en un contexto clínico en comparación con este modelo de tumor único que no es representativo de enfermedad metastásica.

Ejemplo 12

La combinación de LTX-315 con un anticuerpo anti-ligando de proteína de muerte celular programada 1 (PD-L1) se sometió a ensayo en un modelo de carcinoma de mama EMT-6 de ratón.

Materiales y métodos

El anticuerpo anti-PD-L1 tenía las siguientes características: ref: BE0101, Bioxcell; clon 10F.9G2; reactividad: ratón; isotipo: IgG2b de rata. Se preparó LTX-315 a una dosis de 0,5 mg/50 µl en una solución de cloruro de sodio al 0,9 %. Se preparó anticuerpo anti-PD-L1 a una concentración en solución salina tamponada con fosfato y se administró a una dosis de 10 mg/kg. Se inyectó LTX-315 en el tumor injertado en el flanco derecho de los ratones, se inyectó anticuerpo anti-PD-L1 en la cavidad peritoneal de los ratones.

La línea celular EMT-6 se estableció a partir de un carcinoma mamario murino trasplantable que surgió en un ratón BALB/cCRGL después de la implantación de un nódulo alveolar mamario hiperplásico (VOLENEC FJ., *et al.*, J Surg Oncol. 13(1):39-44, 1980).

Condiciones de los cultivos celulares: Se cultivaron células tumorales EMT-6 como una monocapa a 37 °C en una atmósfera humidificada (CO₂ al 5 %, aire al 95 %). El medio de cultivo fue RPMI 1640 que contenía L-glutamina 2 mM (ref: BE12-702F, Lonza, Verviers, Bélgica) complementado con suero bovino fetal al 10 % (ref: 3302, Lonza). Las células tumorales EMT-6 se adhieren a matraces de plástico. Para su uso experimental, las células tumorales se desprendieron del matraz de cultivo mediante un tratamiento de 5 minutos con tripsina-versene (ref: BE17-161E, Lonza), en medio de Hanks sin calcio ni magnesio (ref: BE10-543F, Lonza) y se neutralizó mediante la adición de medio de cultivo completo. Las células se contaron en un hemocitómetro y se evaluó su viabilidad mediante un ensayo de exclusión de azul tripan al 0,25 %.

Uso de ratones: Se obtuvieron ratones Balb/C hembras sanas, de 6-8 semanas de edad en el momento de la recepción, de CHARLES RIVER (L'Arbresles, Francia) y de Janvier (Francia). Los ratones se mantuvieron en un estado sanitario SPF (forma siglada de *Specific pathogen free*, sin patógenos específico) de acuerdo con las directrices de la FELASA (forma siglada de *Federation of European Laboratory Animal Science Association*, Federación de Asociaciones Europeas de Ciencias del Animal de Laboratorio). El alojamiento de los ratones y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las normas francesas y europeas (Regla ética de la experimentación animal, Directiva n.º 2010/63 CEE del 22 de septiembre de 2010, Decreto n.º 2013-118 del 1 de febrero de 2013) y la Guía del NRC (forma siglada de *National Research Council*, Consejo nacional de investigación) para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Guía del NRC para el cuidado y uso de animales de laboratorio). El animalario fue autorizado por las autoridades francesas (Acuerdo N.º B 21 231 011 EA). Todos los procedimientos utilizando ratones se enviaron al Comité de Uso y Cuidado Animal de OncoDesign (Oncomet) acordado por las autoridades francesas (acuerdo CNREEA N.º 91). Los ratones se identificaron individualmente con un transpondedor con IDRF y cada jaula se etiquetó con un código específico.

Condiciones de alojamiento: Los ratones se mantuvieron en salas de alojamiento en condiciones ambientales controladas: Temperatura: 22 ± 2 °C, Humedad 55 ± 10 %, Fotoperíodo (12 h de luz/12 h de oscuridad), Aire filtrado por HEPA, 15 intercambios de aire por hora sin recirculación. Los recintos para ratones proporcionaron un espacio estéril y adecuado con material de lecho, comida y agua, enriquecimiento ambiental y social (alojamiento grupal) como se describe: Jaulas de policarbonato con filtro superior Eurostandard Tipo III o IV, lecho de mazorcas de maíz (ref: LAB COB 12, SERLAB, Francia), dieta irradiada a 25 kGy (Ssniff® Soest, Alemania), alimento completo para roedores inmunocompetentes - extruido de R/M-H, agua estéril, filtrado a 0,2 µm y enriquecimiento ambiental (SIZZLE-dri kraft - D20004 SERLAB, Francia).

Inducción de tumores de MET-6 en ratones: Se indujo un primer tumor mediante inyección subcutánea de 1x10⁶ células EMT-6 en 200 µl de RPMI 1640 en el flanco derecho de ratones hembra Balb/C. El día de la inyección de las células tumorales en el flanco derecho se consideró como D0. Se indujo un segundo tumor mediante inyección subcutánea de 1x10⁵ células EMT-6 en 200 µl de RPMI 1640 en el flanco izquierdo de ratones hembra Balb/C. El día de la inyección de las células tumorales en el flanco izquierdo se consideró como D3.

Programa de tratamiento: Los ratones se asignaron al azar de acuerdo con su peso corporal el D3 en cuatro grupos, cada uno de 5 ratones (grupo 1) o 10 ratones (grupos 3, 5 y 7), utilizando el programa informático Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Francia). Se realizó una prueba estadística (análisis de varianza) para probar la homogeneidad entre los grupos. Se realizó una prueba estadística (análisis de varianza) para probar la homogeneidad entre los grupos.

El programa de tratamiento fue el siguiente: los ratones del grupo 1 no se trataron; los ratones del grupo 3 recibieron un total de 3 inyecciones intratumorales de LTX135; los ratones del grupo 5 recibieron un total de 6 inyecciones i.p. de anti-PD-L1; y los ratones del grupo 7 recibieron un total de 3 inyecciones intratumorales de LTX315 y un total de 6 inyecciones i.p. de anti-PD-L1.

El programa de tratamiento se resume a continuación en la Tabla 17:

Tabla 17

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Programa de tratamiento
G1	5	No tratados	-
G3	10	LTX315	Q1Dx3
G5	10	Anti-PD-L1	Q2Dx6
G7	10	LTX315	Q1Dx3
		Anti-PD-L1	Q2Dx6

Q1Dx3 = una inyección durante 3 días (total de 3 inyecciones).
Q2Dx6 = una inyección cada 2 días (total de 6 inyecciones).

Control de los ratones: Todos los datos del estudio, entre ellos las mediciones del peso corporal de los ratones, el volumen del tumor, los registros clínicos y de mortalidad, y el tratamiento se programaron y registraron en la base de datos Vivo Manager® (Biosystemes, Dijon, Francia). La viabilidad y el comportamiento se registraron todos los días. Los pesos corporales se midieron tres veces por semana. La longitud y la anchura del tumor se midieron tres veces por semana con calibradores y el volumen del tumor se estimó mediante la siguiente fórmula: volumen del tumor = (anchura² x largo)/2 (SIMPSON-HERREN L. *et al.* Cancer Chemotherapy Rep., 54: 143, 1970).

Pruebas estadísticas: Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Francia). Análisis estadísticos de los pesos corporales medios, el CPCM, los volúmenes tumorales medios en la asignación al azar, los volúmenes tumorales medios, los tiempos medios para alcanzar los volúmenes tumorales medios y los tiempos medios de duplicación del tumor se realizaron utilizando ANOVA y las pruebas por pares se realizaron utilizando la corrección de Bonferroni/Dunn en caso de resultados de ANOVA significativos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

Como se muestra en la Figura 21, el 50 % de los ratones de prueba sobrevivieron durante más de 50 días después de la inducción del tumor cuando se les administró tanto LTX-315 como anticuerpo anti-PD-L1, en comparación con el 40 % de los ratones de prueba tratados con anticuerpo anti-PD-L1 solo, el 30 % de los ratones de prueba tratados con LTX-315 solo y con ninguno en los ratones no tratados. Esto muestra que la terapia de combinación es más eficaz tanto para tratar directamente tumores (tratar el tumor en el flanco derecho del ratón) como para inducir una respuesta inmunitaria adaptativa (tratar el tumor en el flanco izquierdo del ratón).

Los detalles con respecto al porcentaje de ratones que muestran remisión tumoral total en el flanco derecho y/o izquierdo se muestran a continuación en la Tabla 18. Los ratones se analizaron el día 52 después de la inoculación o cuando se sacrificaron.

Tabla 18

Grupo	Flanco	Proporción de ratones
G1	Derecho	0 %
	Izquierdo	0 %
G3	Derecho	30 %
	Izquierdo	10 %
G5	Derecho	20 %
	Izquierdo	20 %
G7	Derecho	20 %
	Izquierdo	40 %

La tabla muestra que la combinación de LTX-315 y anticuerpo anti-PD-L1 es particularmente eficaz para inducir la inmunidad adaptativa, ya que el 40 % de los ratones tratados con la combinación (G7) mostraron remisión total del

tumor en el flanco izquierdo, en comparación con el 10 % de los ratones tratados con LTX-315 solo (G3), el 20 % de los ratones tratados con anticuerpo anti-PD-L1 solo (G5) y con ninguno de los ratones no tratados (G1).

Se midió el volumen tumoral mediano y medio para cada cohorte y, si bien G3 y G5 siempre proporcionaron volúmenes significativamente más bajos que G1, G7 siempre fue claramente la cohorte con mejor desempeño.

Se apreciará que no se pretende limitar la presente invención únicamente a las realizaciones específicas anteriores, siendo fácilmente evidentes numerosas realizaciones, modificaciones y mejoras para un experto en la materia, sin apartarse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lytix Biopharma AS

<120> INHIBIDORES DE PUNTOS DE CONTROL

<130> 59.67.123660

<160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> Aminoácido catiónico

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> Aminoácido lipófilo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(6)

<223> Aminoácido catiónico

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> Aminoácido lipófilo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Aminoácido catiónico

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
5	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
10	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2)..(3)	
	<223> Aminoácido catiónico	
15	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(5)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (6)..(7)	
	<223> Aminoácido catiónico	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (8)..(8)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
30	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Aminoácido catiónico	
35	<400> 2	
		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
		1 5
40	<210> 3	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
50	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Aminoácido catiónico	
55	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2)..(3)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
60	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(5)	
	<223> Aminoácido catiónico	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (6)..(7)	

	<223> Aminoácido lipófilo	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
5	<222> (8)..(9)	
	<223> Aminoácido catiónico	
	<400> 3	
		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
10		1 5
	<210> 4	
	<211> 9	
	<212> PRT	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(2)	
	<223> Aminoácido catiónico	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3)..(4)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
30	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(5)	
	<223> Aminoácido catiónico	
35	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (6)..(7)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (8)..(9)	
	<223> Aminoácido catiónico	
45	<400> 4	
		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
		1 5
	<210> 5	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Secuencia sintética	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(1)	
60	<223> Aminoácido catiónico	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	

	<222> (2)..(2)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
5	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3)..(4)	
	<223> Aminoácido catiónico	
10	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
15	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (7)..(8)	
	<223> Aminoácido catiónico	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
25	<400> 5	
		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
		1 5
30	<210> 6	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(2)	
	<223> Aminoácido catiónico	
45	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3)..(3)	
	<223> Aminoácido lipófilo no codificado genéticamente	
50	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(4)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
55	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Aminoácido catiónico	
60	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (7)..(8)	
	<223> Aminoácido lipófilo	
65	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Aminoácido catiónico	

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

5

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

10

<220>
<223> Secuencia sintética

15

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Aminoácido catiónico

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(4)
<223> Aminoácido lipófilo

25

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> Aminoácido catiónico

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Aminoácido lipófilo

35

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Aminoácido lipófilo no codificado genéticamente

40

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Aminoácido catiónico

<400> 7

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

50

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55

<220>
<223> Secuencia sintética

60

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Aminoácido catiónico

<220>
<221> MISC_FEATURE

	<222> (3)..(3)
	<223> Aminoácido lipófilo
5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (4)..(4) <223> Aminoácido lipófilo no codificado genéticamente
10	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (5)..(6) <223> Aminoácido catiónico
15	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (7)..(8) <223> Aminoácido lipófilo
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (9)..(9) <223> Aminoácido catiónico
25	<400> 8 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 1 5
30	<210> 9 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial
35	<220> <223> Secuencia sintética
40	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(1) <223> Aminoácido lipófilo
45	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (2)..(3) <223> Aminoácido catiónico
50	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (4)..(4) <223> Aminoácido lipófilo
55	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (5)..(5) <223> Aminoácido lipófilo no codificado genéticamente
60	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (6)..(7) <223> Aminoácido catiónico
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (8)..(8) <223> Aminoácido lipófilo

5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (9)..(9) <223> Aminoácido catiónico <400> 9	
10		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 1 5
15	<210> 10 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia sintética	
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(1) <223> Difenilalanina <400> 10	
25		Xaa Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Lys 1 5
30	<210> 11 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia sintética	
35	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (5)..(5) <223> difenilalanina <400> 11	
40		Trp Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Lys 1 5
45	<210> 12 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
50	<220> <223> Secuencia sintética <220> <221> MISC_FEATURE <222> (8)..(8) <223> difenilalanina <400> 12	

ES 2 819 282 T3

Trp Lys Lys Trp Trp Lys Lys Xaa Lys
1 5

5 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> bifenilalanina

<400> 13

Xaa Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Lys
1 5

20 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia sintética

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> bifenilalanina

<400> 14

Trp Lys Lys Xaa Trp Lys Lys Trp Lys

35 1 5

40 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia sintética

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> D-aminoácidos

55 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)
 <223> difenilalanina

 <400> 15
 5

 Trp Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Lys
 1 5

 <210> 16
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 15

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> difenilalanina
 20

 <400> 16

 Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
 1 5

 25 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia sintética

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (1)..(2)
 <223> D-aminoácido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (4)..(4)
 <223> difenilalanina

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (5)..(6)
 <223> D-aminoácido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (9)..(9)
 <223> D-aminoácido

 <400> 17

 Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
 1 5
 55

 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> difenilalanina

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> difenilalanina

15

<400> 18

Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Xaa Lys
 1 5

20

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Secuencia sintética

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> bifenilalanina

<400> 19

Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
 1 5

35

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia sintética

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> bifenilalanina

<400> 20

50

Lys Xaa Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp
 1 5

55

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> bifenilalanina
 5 <400> 21
 Lys Lys Xaa Trp Lys Lys Trp Trp Lys
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> difenilalanina
 20
 <400> 22
 Lys Lys Trp Trp Lys Lys Xaa Trp Lys
 1 5
 25
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> difenilalanina
 40
 <400> 23
 Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Xaa Lys
 1 5
 45
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> difenilalanina
 <400> 24
 Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys Lys
 1 5

5 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> difenilalanina

 15 <400> 25

 Lys Lys Trp Trp Lys Trp Xaa Lys Lys
 1 5

 20 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia sintética

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> Orn

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> difenilalanina

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 <223> Orn

 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Orn

 <400> 26

 Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Trp Xaa
 1 5

 50 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia sintética

 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)

	<223> Dpr	
	<220>	
5	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(4)	
	<223> difenilalanina	
	<220>	
10	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Dpr	
	<220>	
15	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Dpr	
	<400> 27	
20		Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Trp Xaa 1 5
	<210> 28	
	<211> 9	
25	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
30	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(4)	
	<223> difenilalanina	
35	<400> 28	
		Arg Arg Trp Xaa Arg Arg Trp Trp Arg 1 5
40	<210> 29	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia sintética	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
50	<222> (6)..(6)	
	<223> difenilalanina	
	<400> 29	
		Lys Trp Trp Lys Lys Xaa Trp Lys Lys 1 5
55	<210> 30	
	<211> 9	
	<212> PRT	
60	<213> Artificial	

	<220> <223> Secuencia sintética	
5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (2)..(2) <223> difenilalanina	
10	<400> 30	
		Lys Xaa Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp 1 5
15	<210> 31 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia sintética	
25	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (3)..(3) <223> difenilalanina	
	<400> 31	
		Lys Lys Xaa Trp Lys Lys Trp Trp Lys 1 5
30	<210> 32 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia sintética	
40	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(9) <223> D-aminoácido	
45	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (6)..(6) <223> difenilalanina	
	<400> 32	
50		Lys Trp Trp Lys Lys Xaa Trp Lys Lys 1 5
55	<210> 33 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia sintética	
60	<220>	

<221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> bifenilalanina
 5 <400> 33
 Arg Arg Xaa Trp Arg Arg Trp Trp Arg
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> difenilalanina
 20
 <400> 34
 Arg Arg Xaa Trp Arg Arg Trp Trp Arg
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> D-aminoácido
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> bifenilalanina
 40
 <400> 35
 45 Lys Lys Xaa Trp Lys Lys Trp Trp Lys
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> D-aminoácido
 60

	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3)..(3)	
5	<223> bifenilalanina	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(9)	
10	<223> D-aminoácido	
	<400> 36	
		Lys Lys Xaa Trp Lys Lys Trp Trp Lys
		1 5
15	<210> 37	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
25	<222> (3)..(3)	
	<223> D-aminoácido	
	<400> 37	
		Lys Lys Xaa Trp Lys Lys Trp Trp Lys
30		1 5
	<210> 38	
	<211> 9	
	<212> PRT	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(2)	
	<223> Dbu	
45	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(4)	
	<223> difenilalanina	
50	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Dbu	
55	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Dbu	
60	<400> 38	

Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Trp Xaa
1 5

5 <210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 1-naftilalanine

15 <400> 39

Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
1 5

20 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (4)..(4)
<223> 2-naftilalanine

<400> 40

Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
1 5

35 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Ácido 2-amino-3-(antracen-9-il)propanoico

50 <400> 41

Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
1 5

55 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia sintética

5

$\langle 220 \rangle$

<221> MISC_FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (4) \dots (\bar{4})$$

<223> Ácido 2-amino-3-[1,1':4',1''-terfenil-4-il]propiónico

10

<400> 42

Lys Lys Trp Xaa Lys Lys Trp Trp Lys
1 5

15

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia sintética

25

$\langle 220 \rangle$

<221> MISC_FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (4) \dots (4)$

<223> Difenilalanina

<400> 43

Lys Ala Gln Xaa Gln Lys Gln Ala Trp
1 5

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que tiene la fórmula Lys Lys Trp Trp Lys Lys Trp Dip Lys, o una sal, éster o amida del mismo; para su uso en el tratamiento de un tumor mediante la coadministración con un agente inmunoterapéutico, en donde el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-CTLA-4.
- 10 2. El compuesto para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab.
- 15 3. El compuesto para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el agente inmunoterapéutico se administra antes que o simultáneamente con el compuesto.
4. El compuesto para su uso como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el agente inmunoterapéutico se administra antes que el compuesto.
- 20 5. Un producto que contiene:
- (i) un compuesto como se define en la reivindicación 1; y
 - (ii) un agente inmunoterapéutico, en donde el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-CTLA-4, como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de tumores.
6. Un producto para su uso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab.

Figura 1

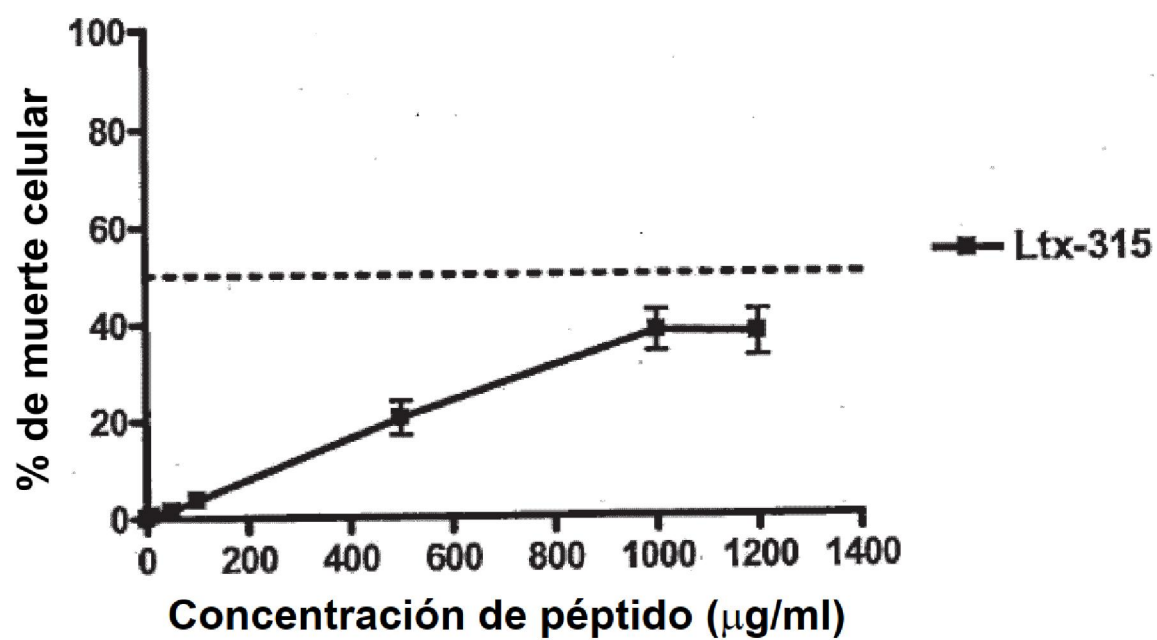


Figura 2

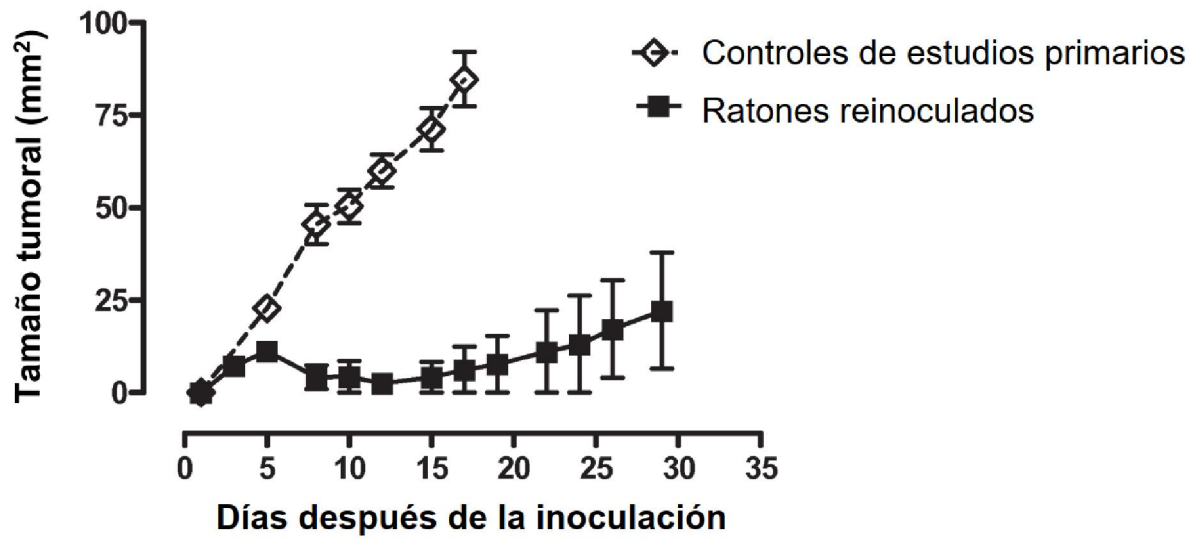


Figura 3

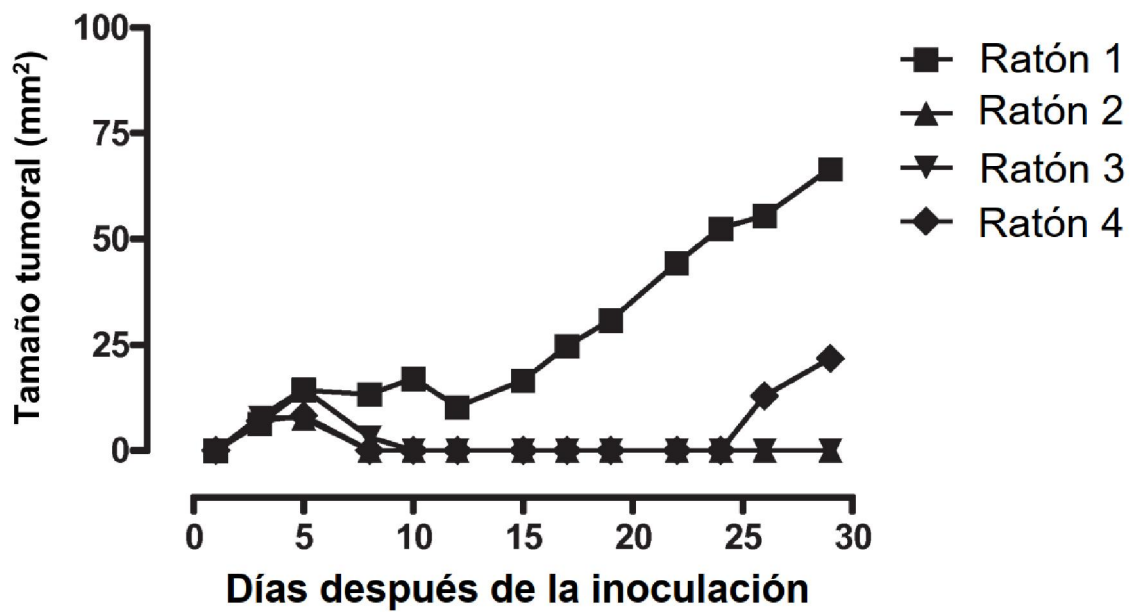


Figura 4

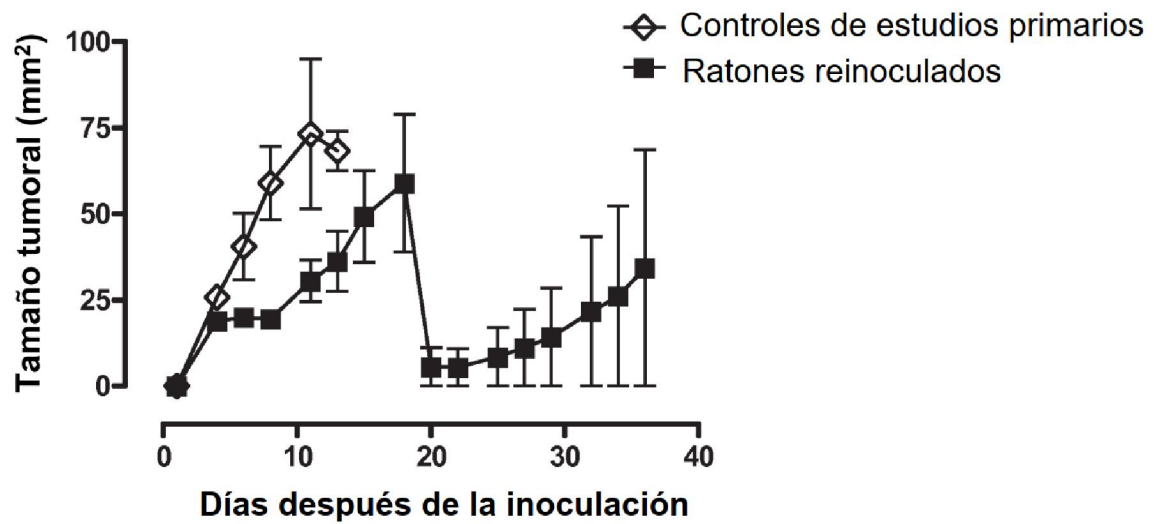


Figura 5

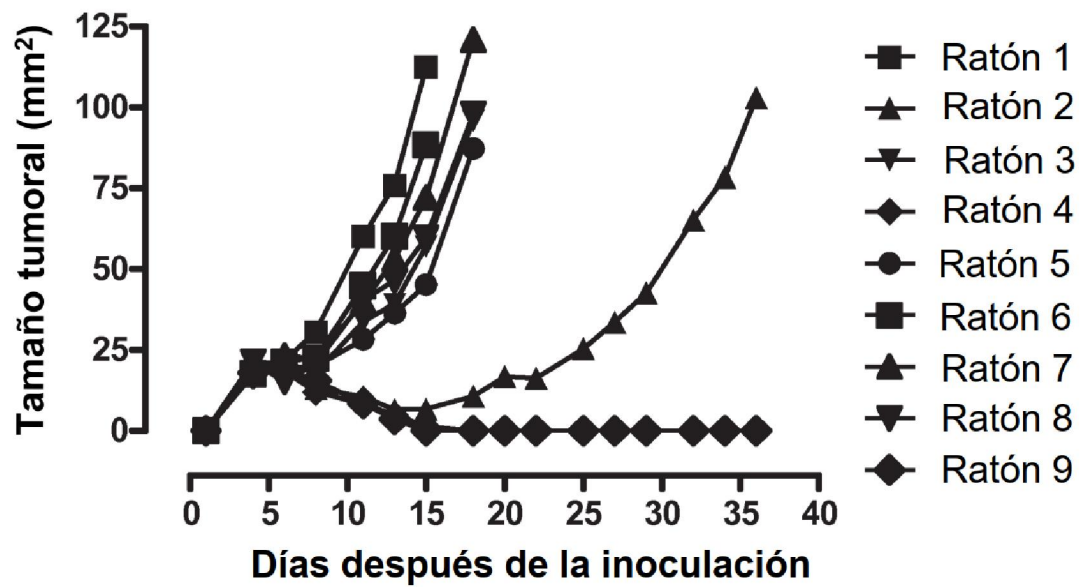


Figura 6

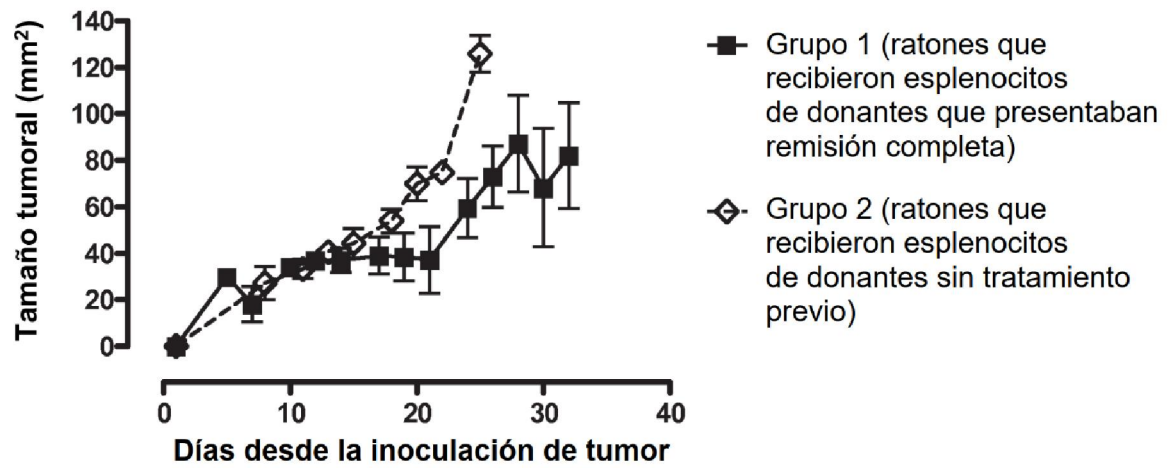


Figura 7

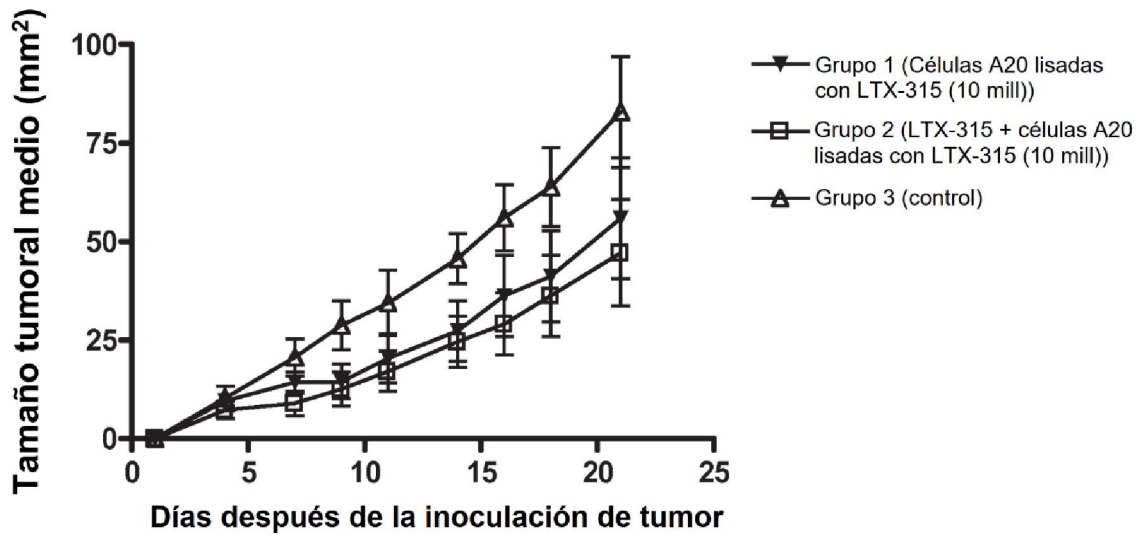


Figura 8a

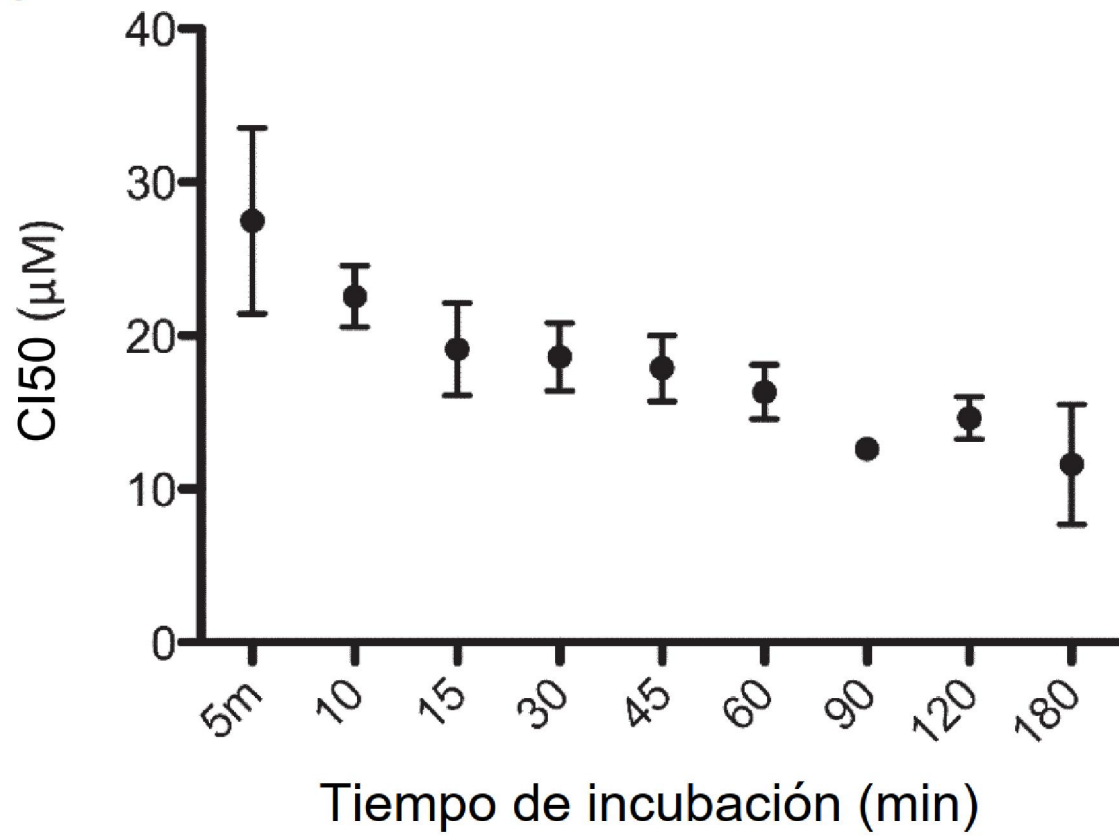


Figura 8b

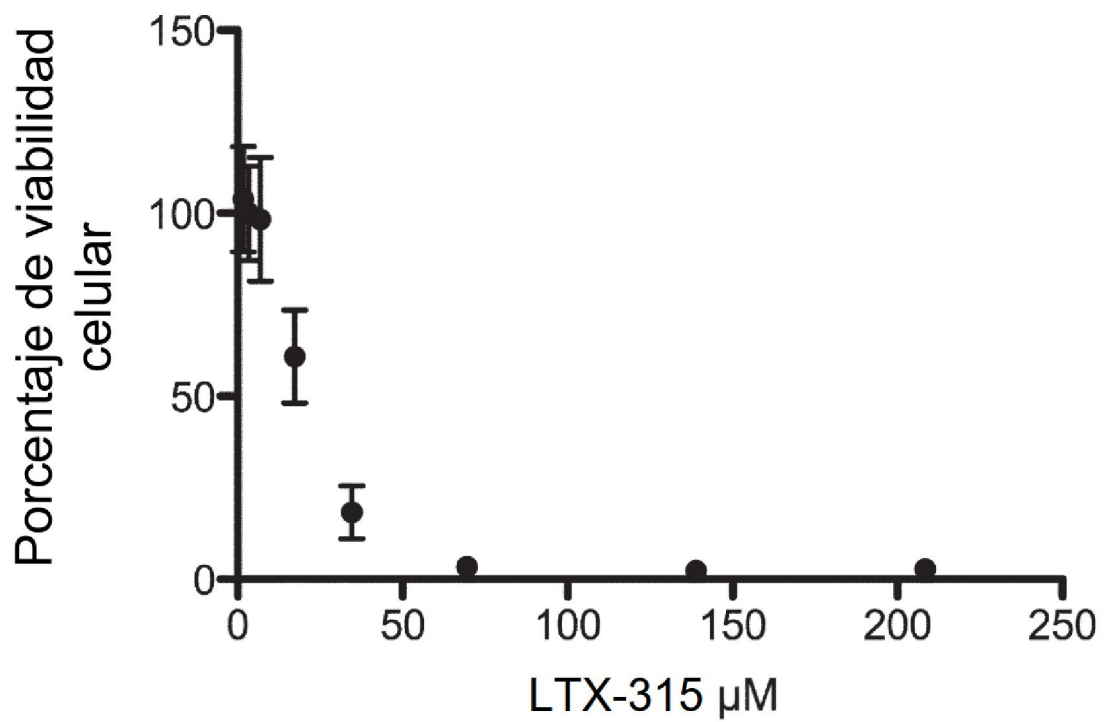


Figura 9

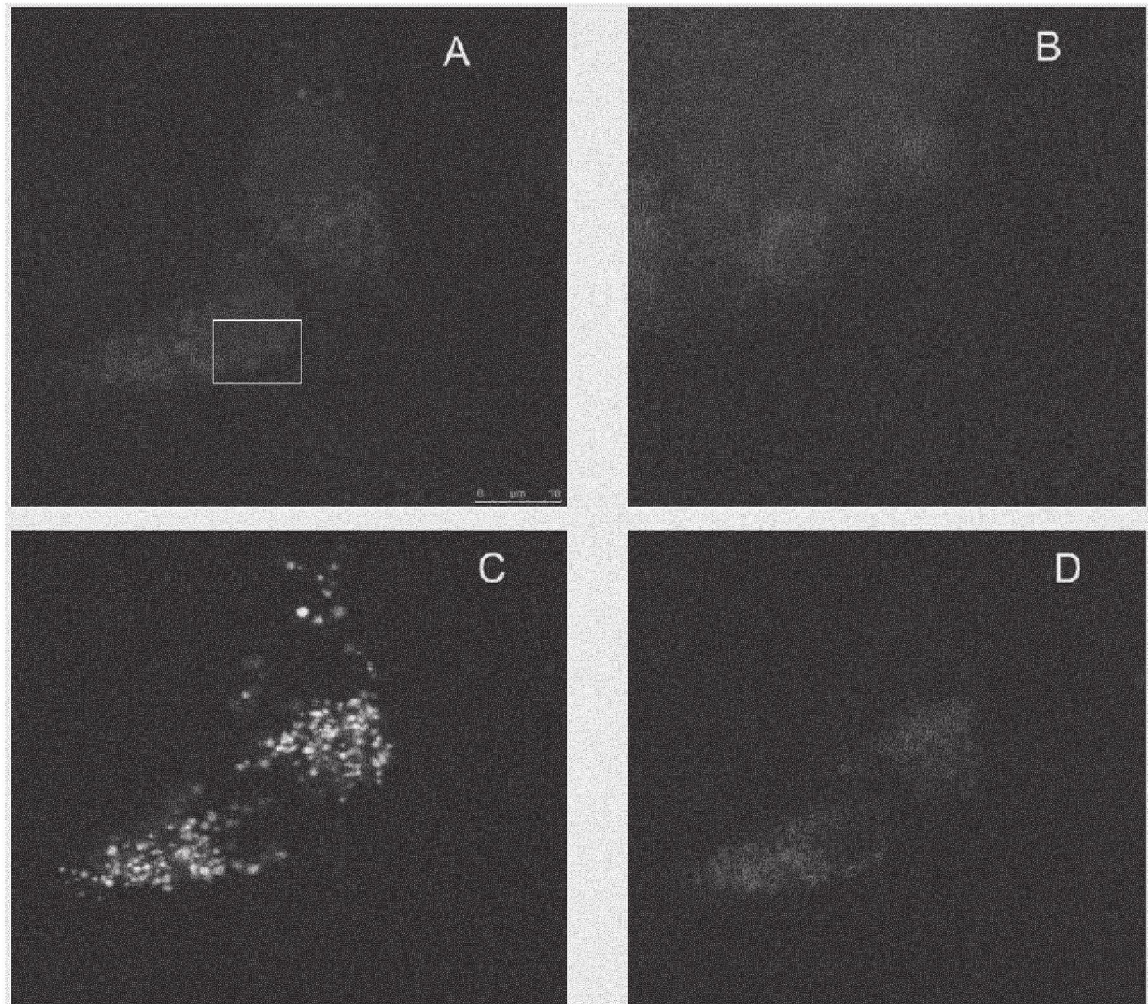


Figura 10

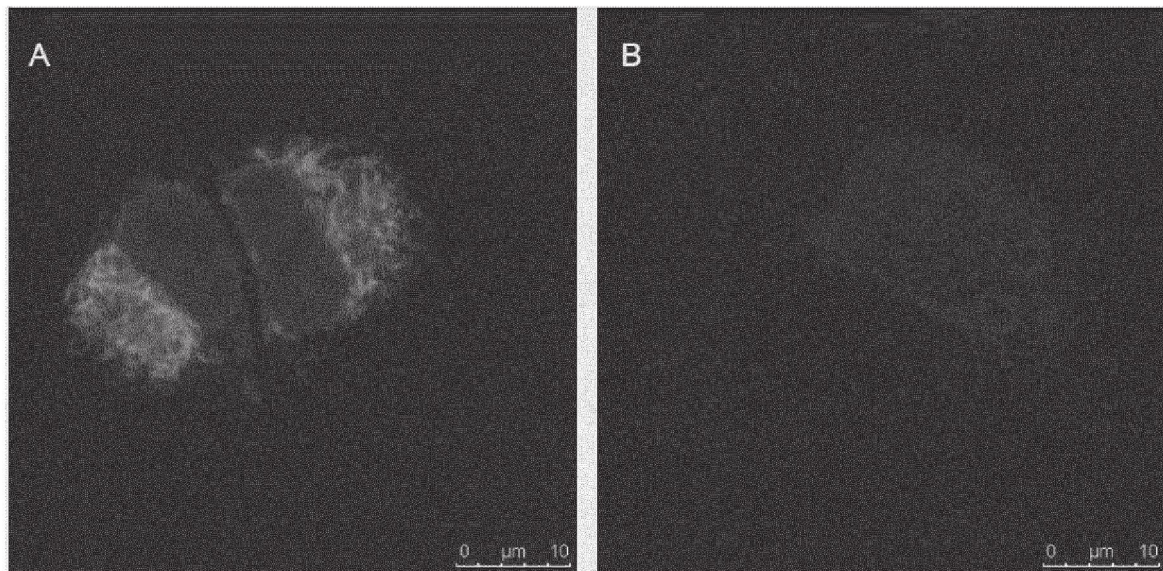


Figura 11

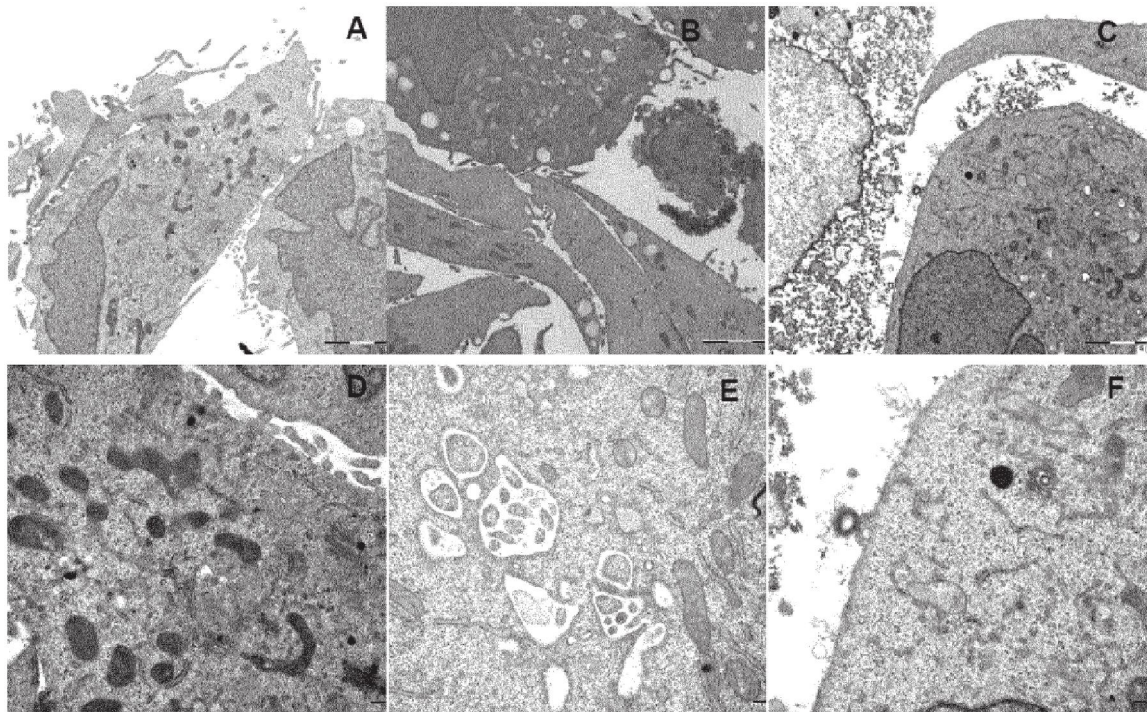


Figura 12

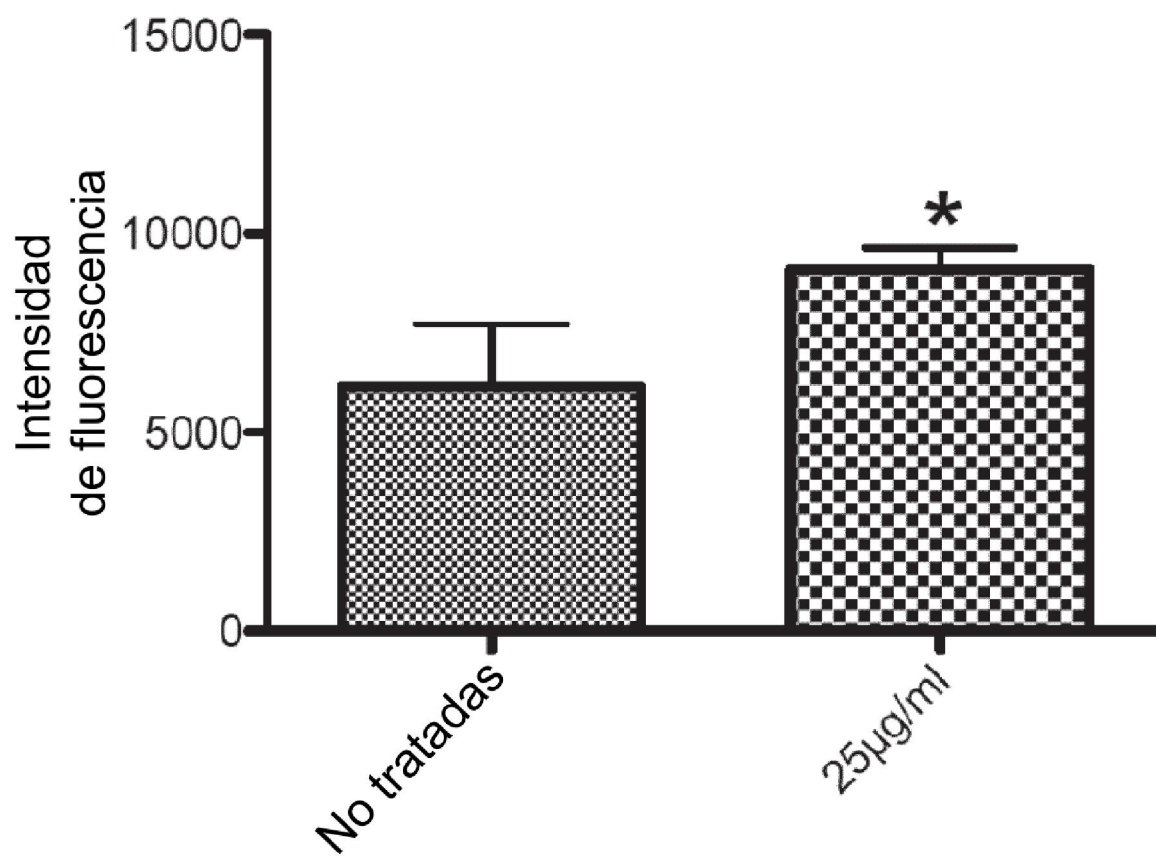


Figura 13

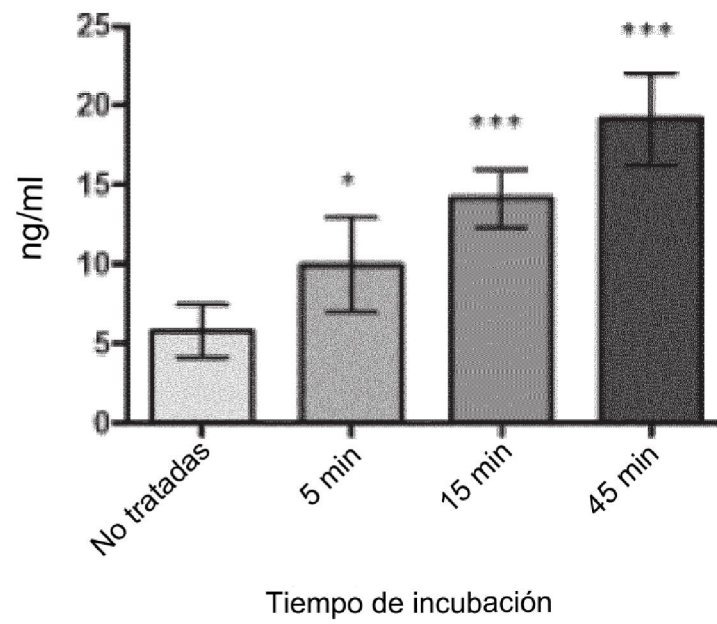


Figura 14



Figura 15

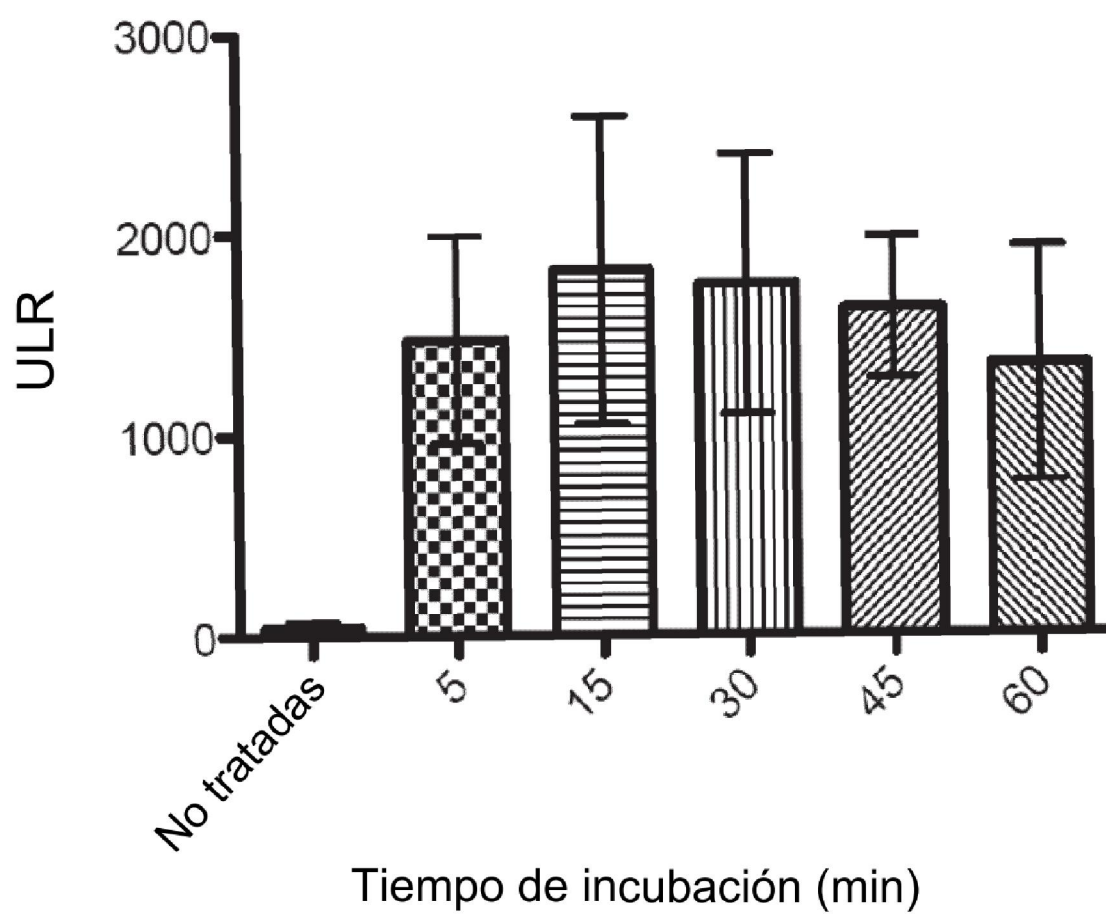
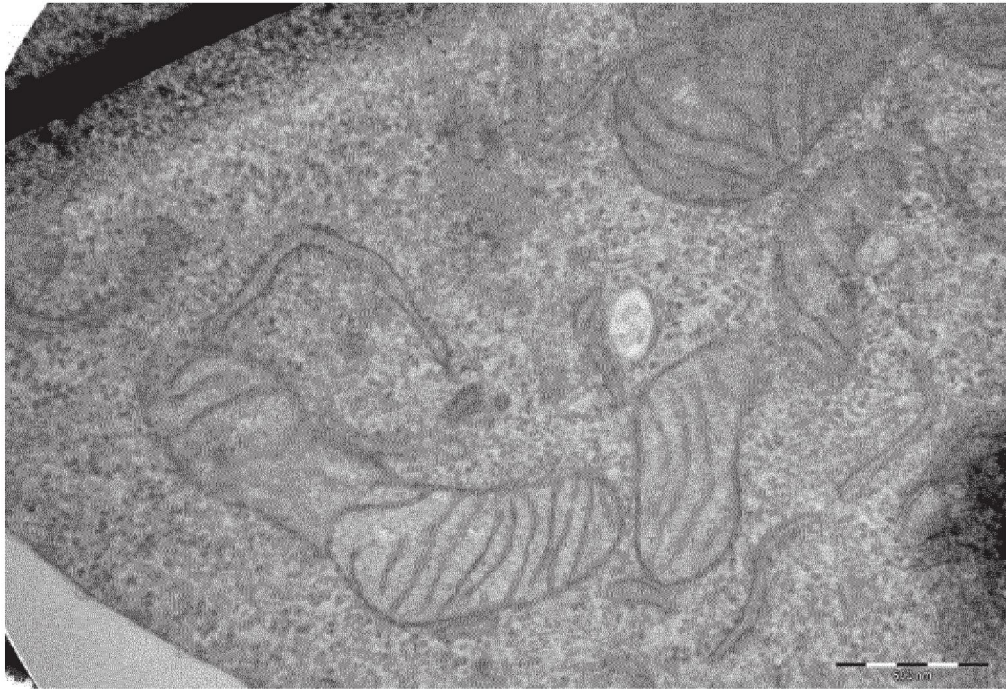


Figura 16

a



b

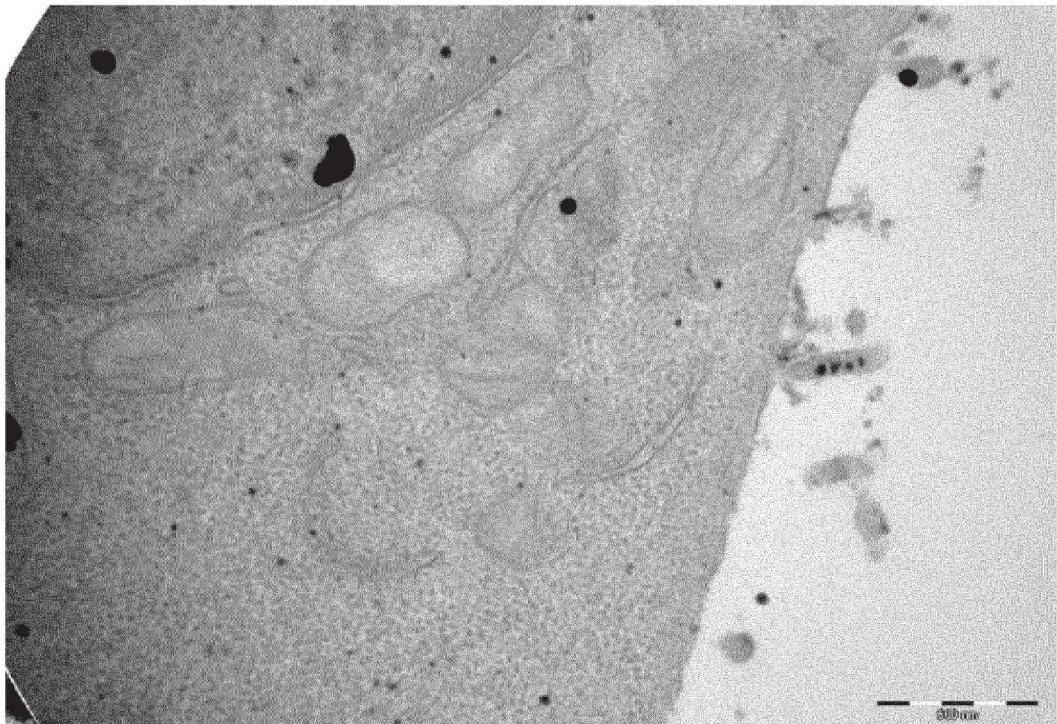


Figura 17a

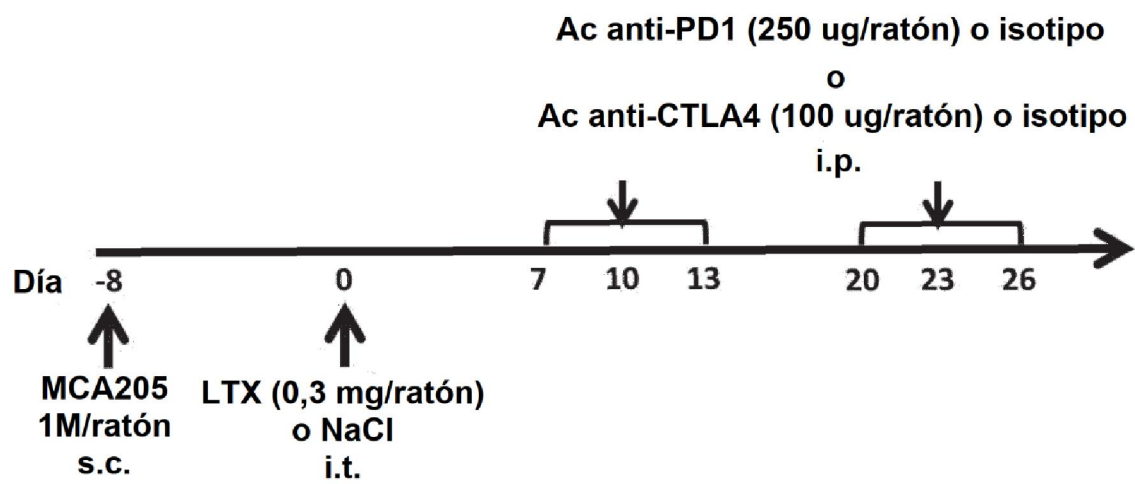


Figura 17b

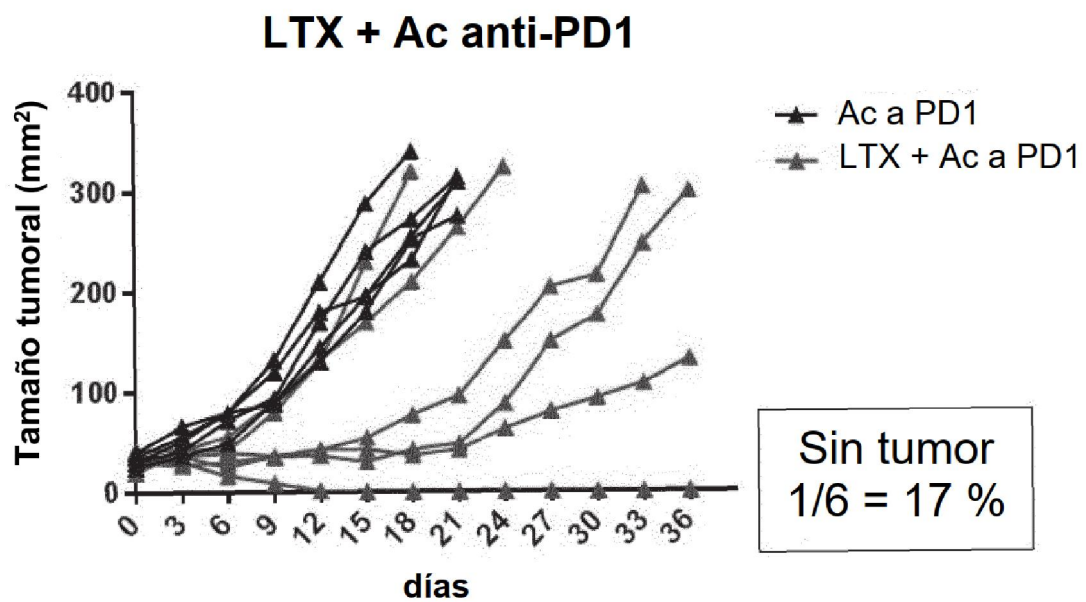
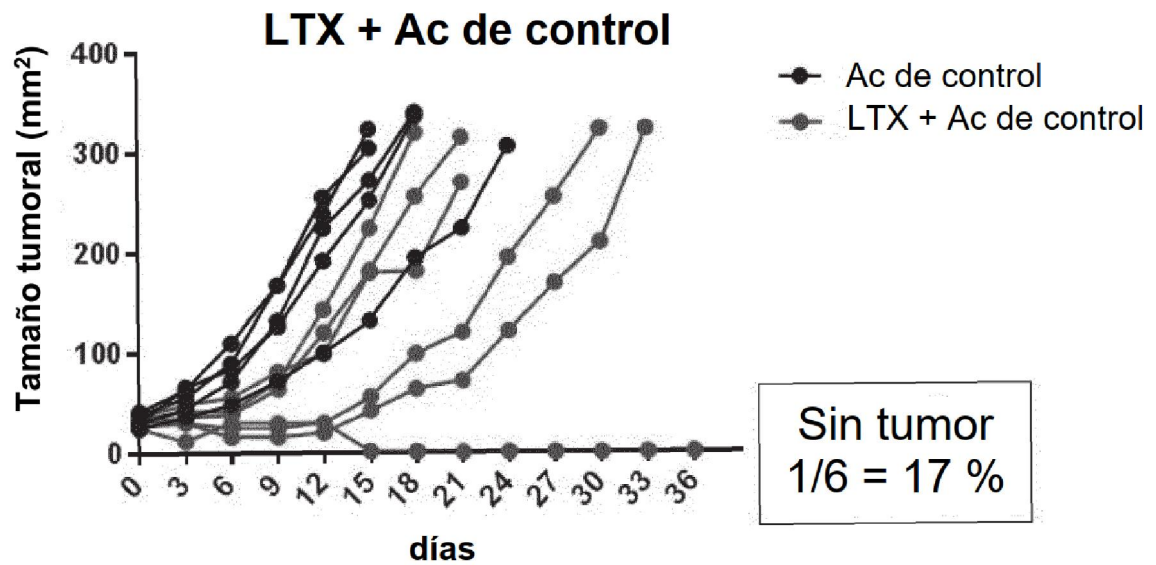


Figura 17c

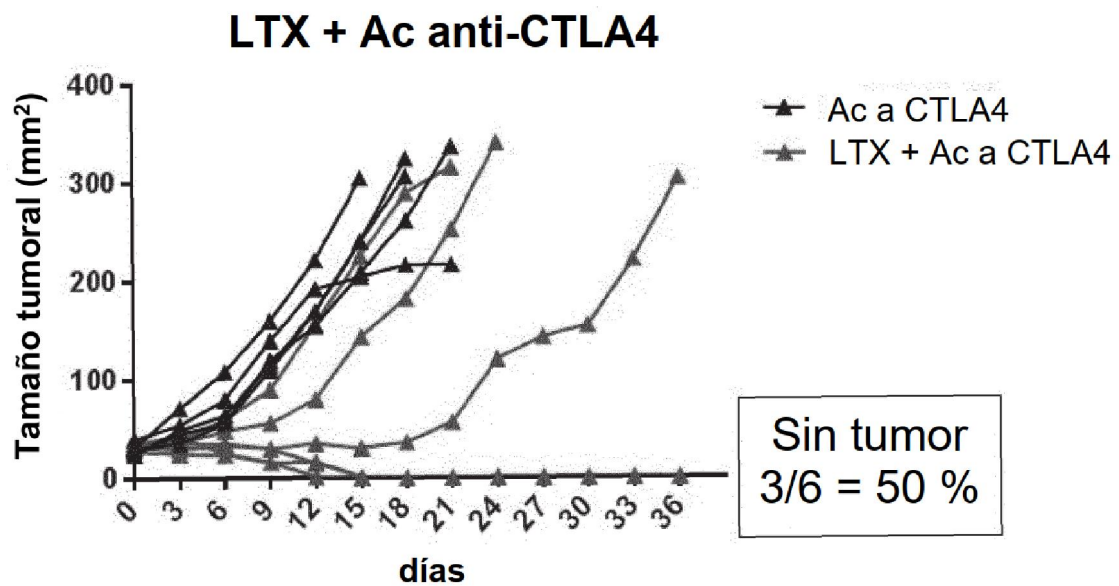
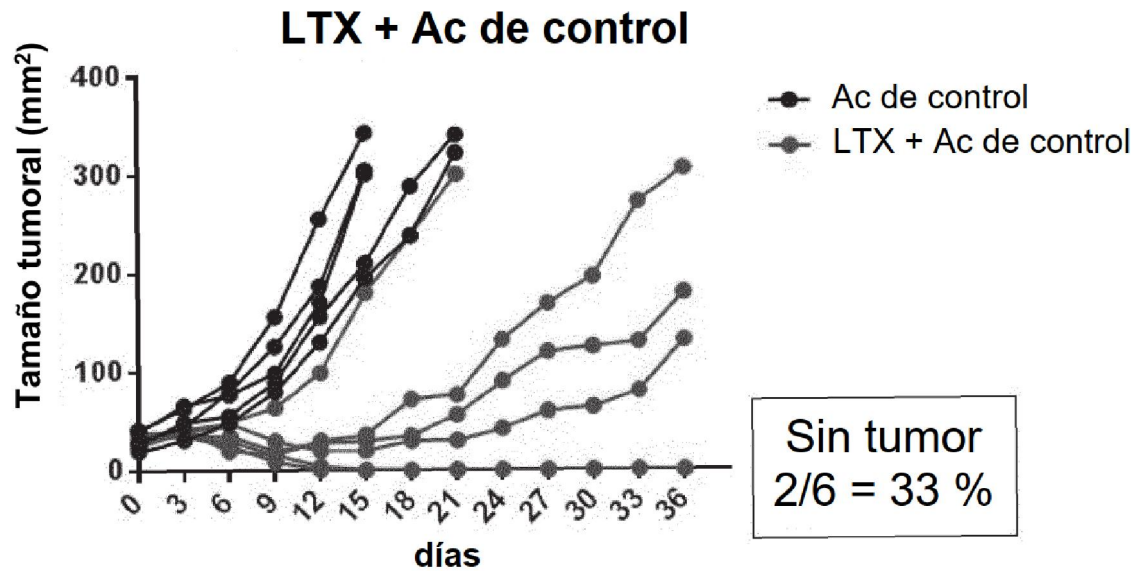


Figura 18a

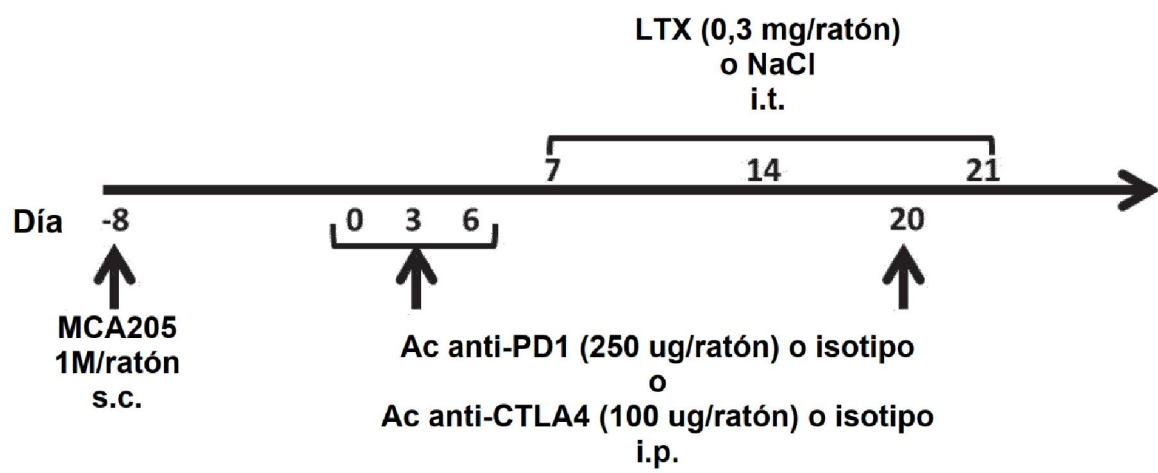


Figura 18b

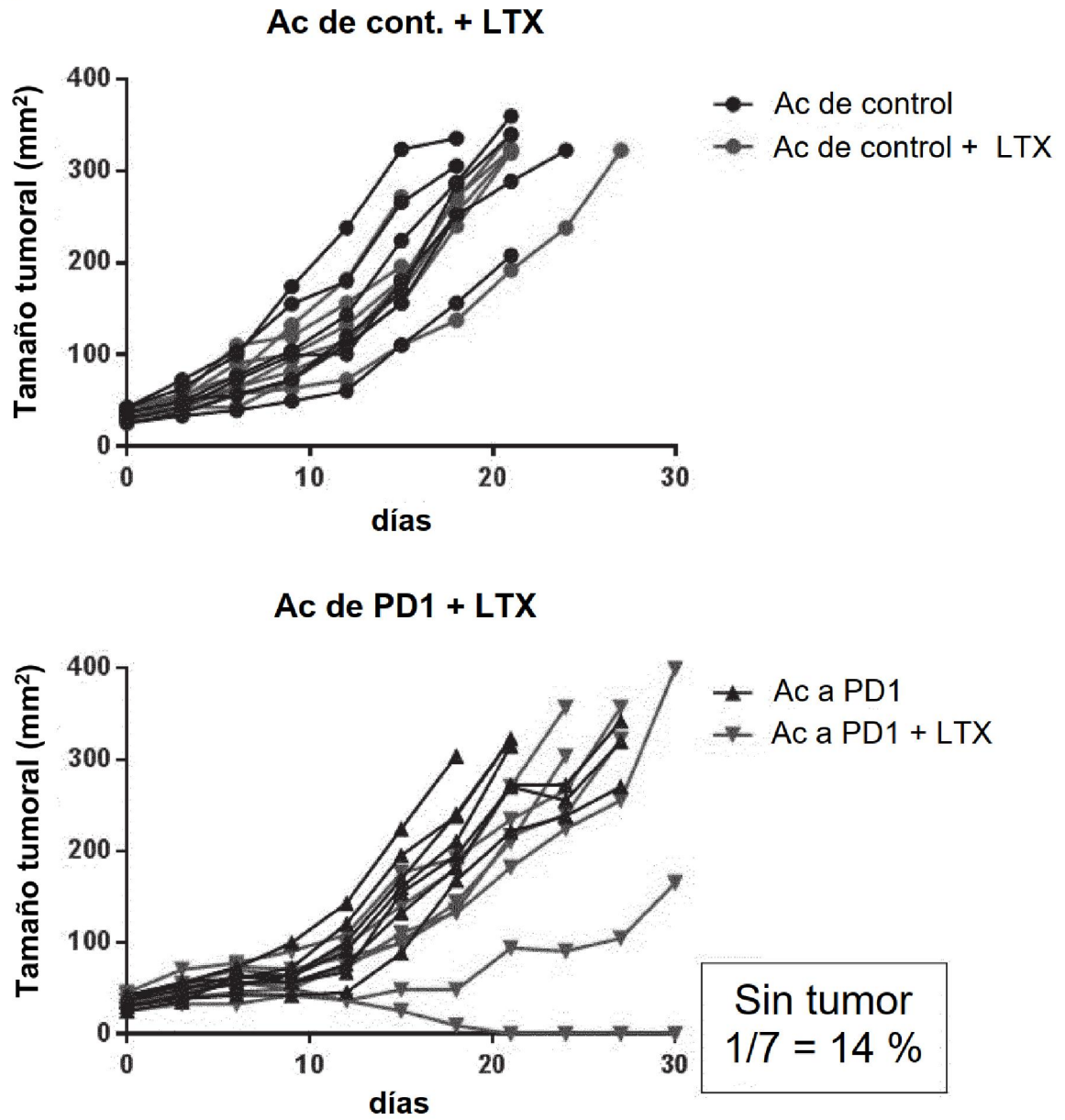


Figura 18c

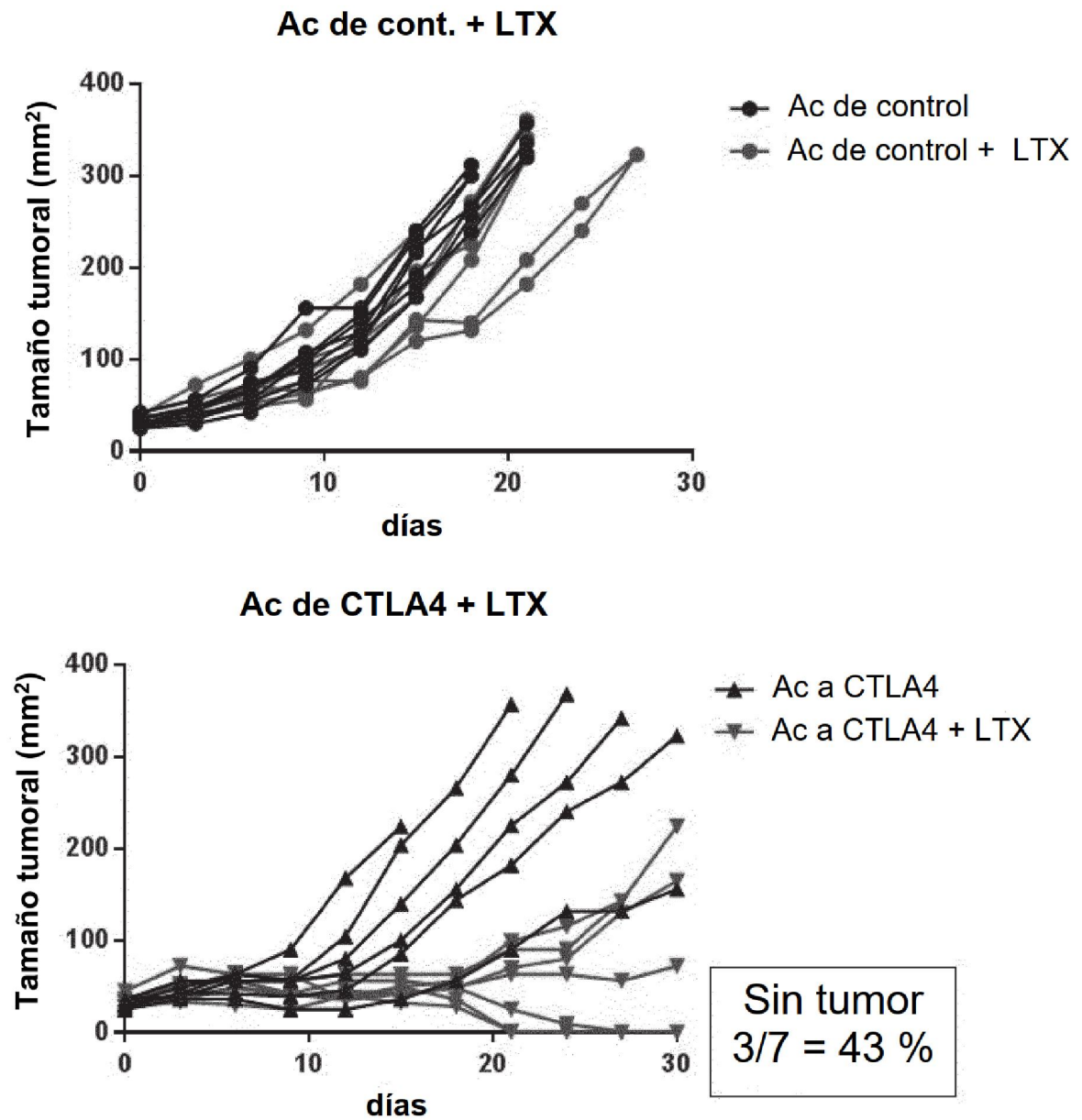


Figura 19a

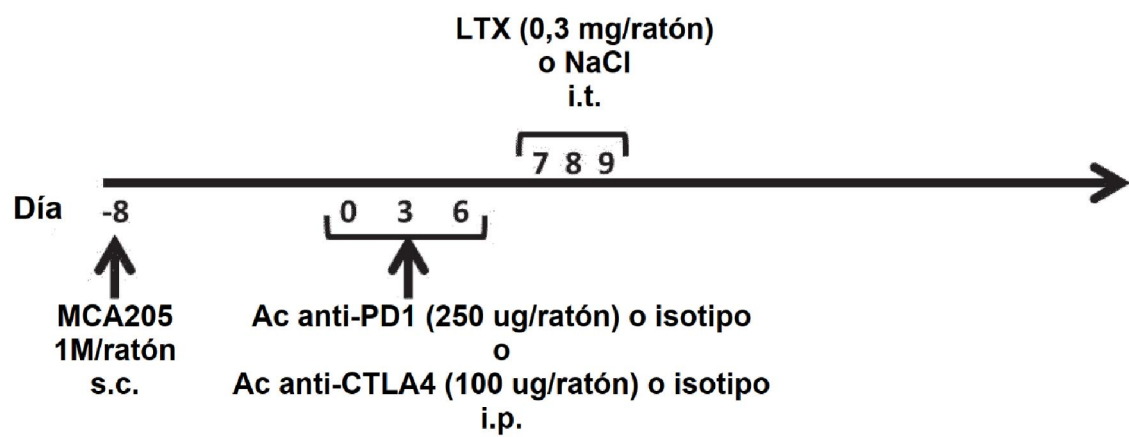


Figura 19b

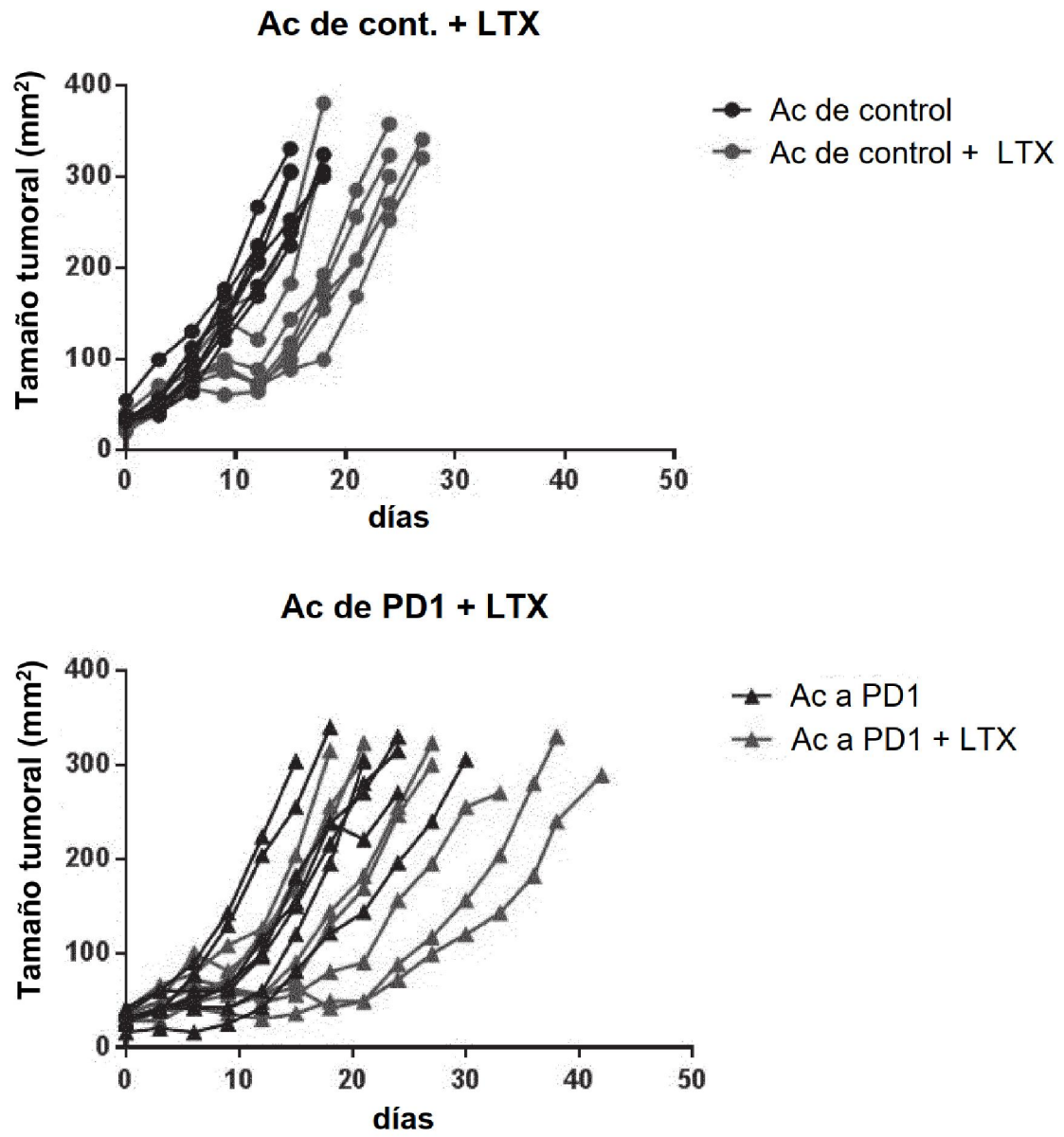


Figura 19c

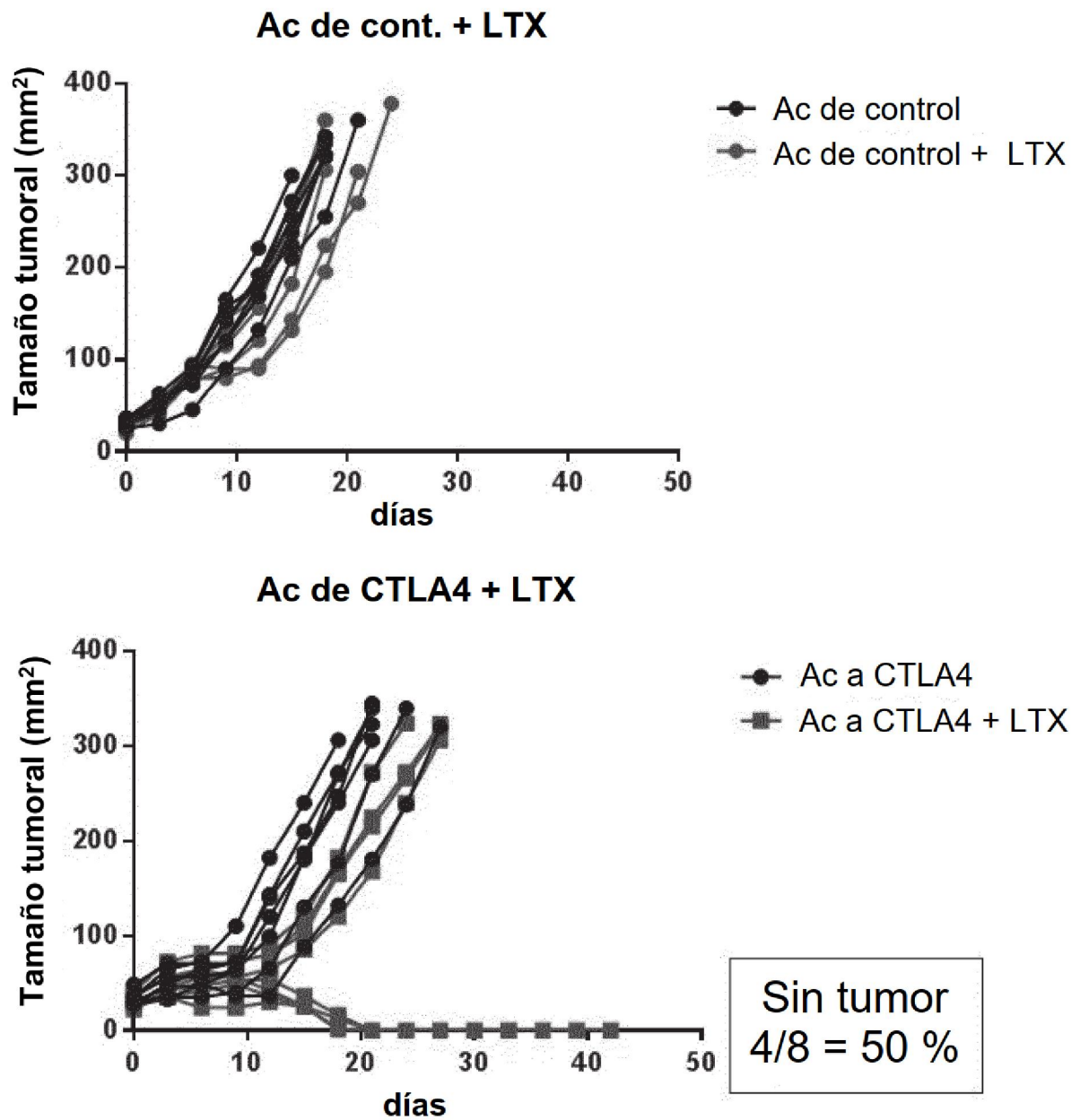


Figura 20a

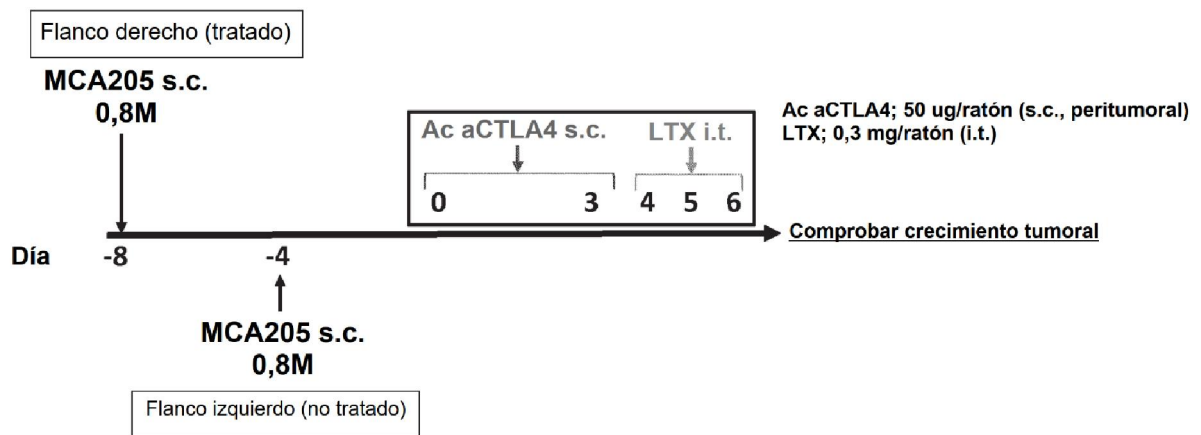


Figura 20b

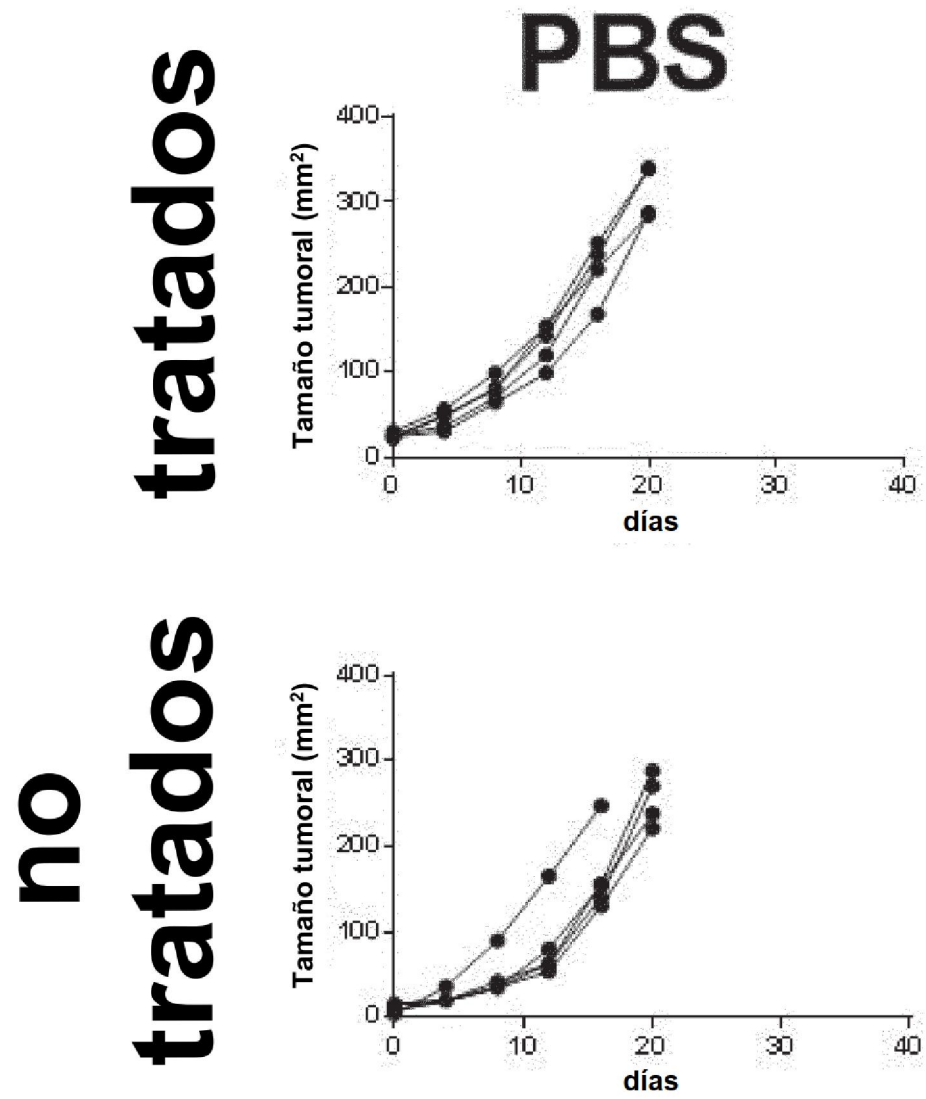


Figura 20c

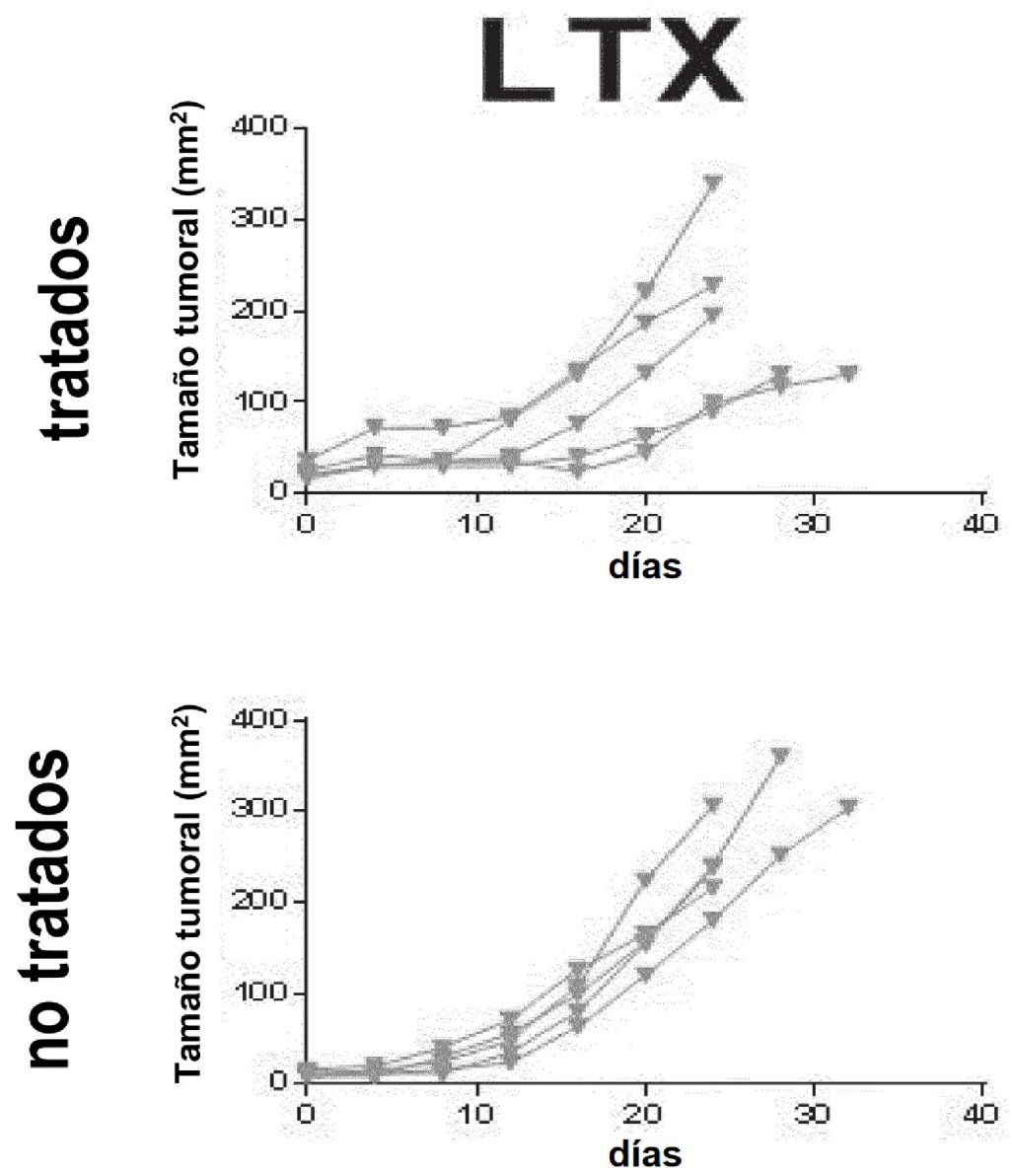


Figura 20d

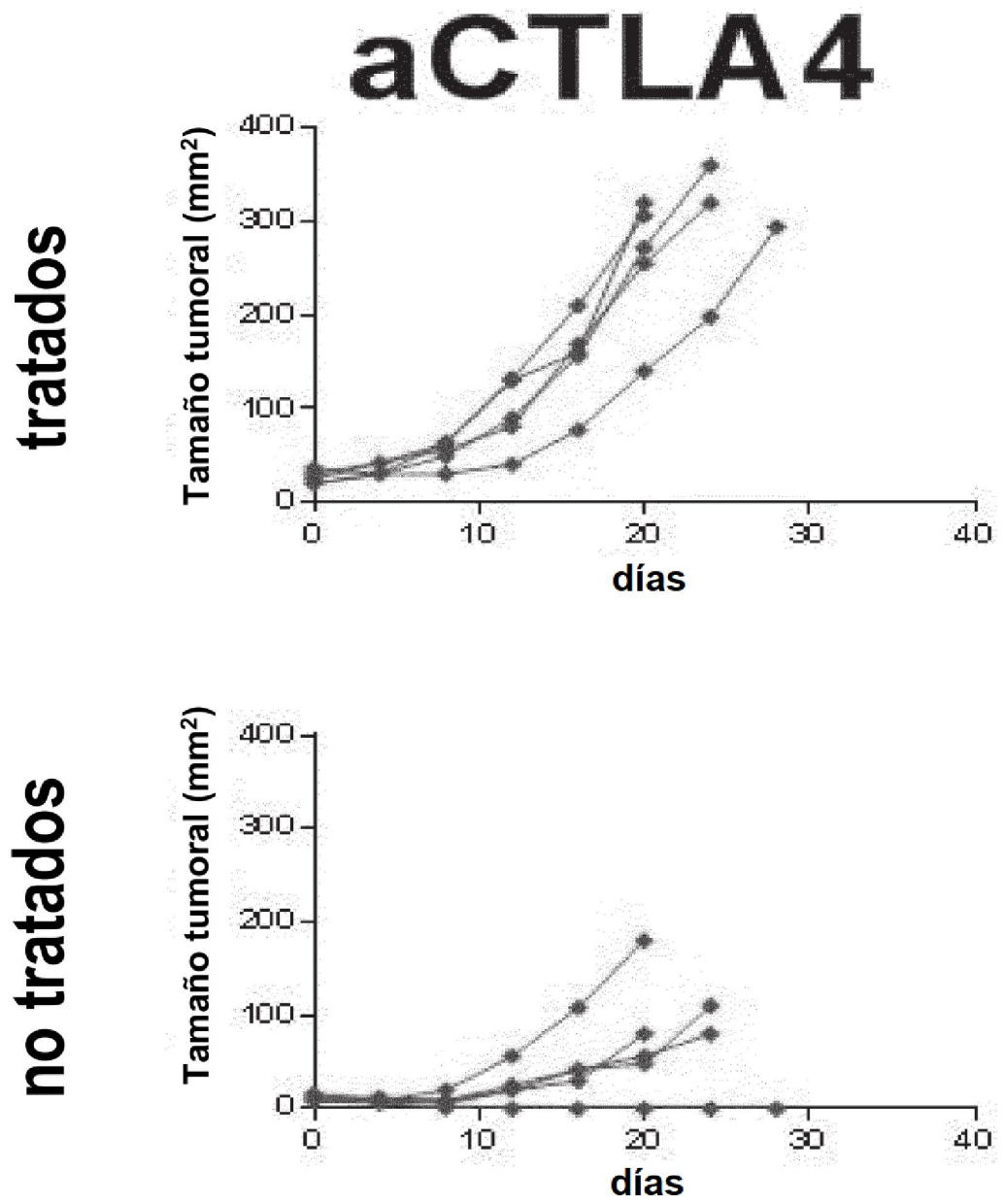


Figura 20e

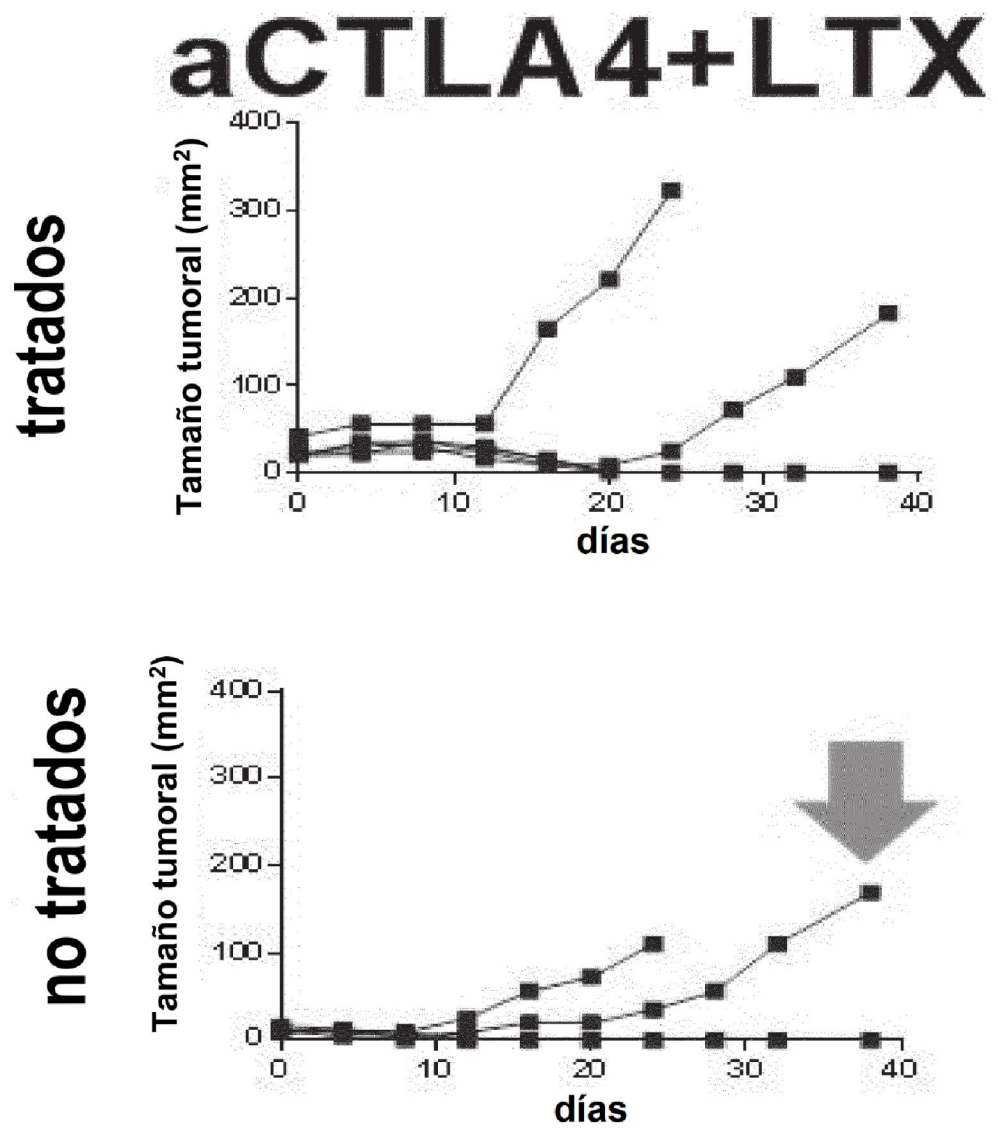


Figura 20f

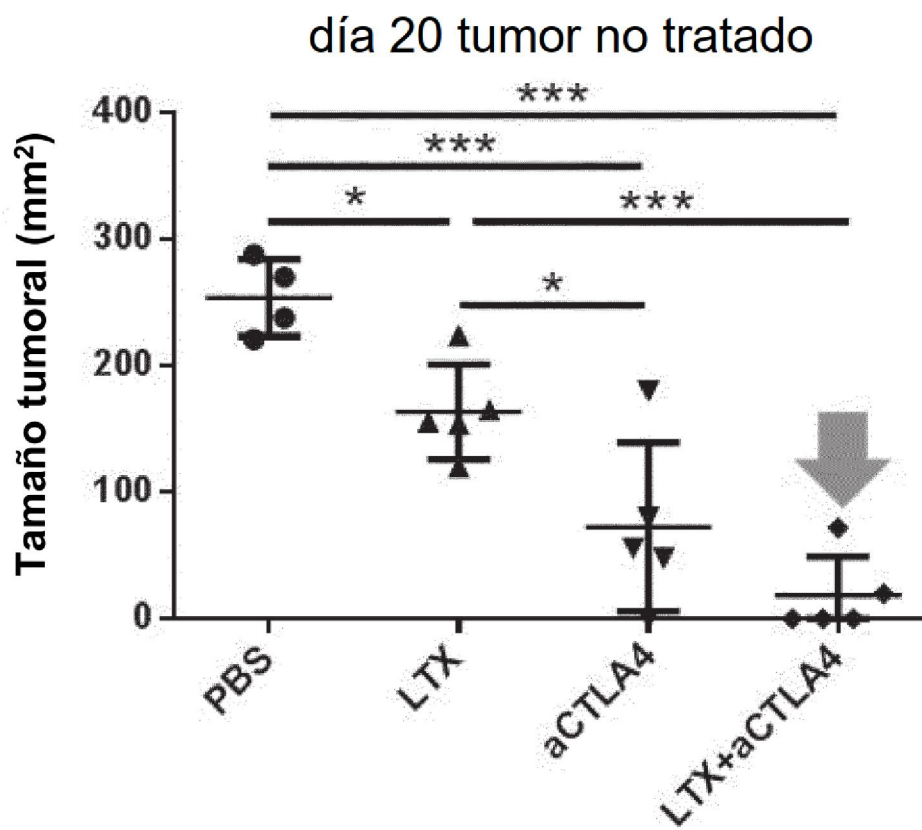
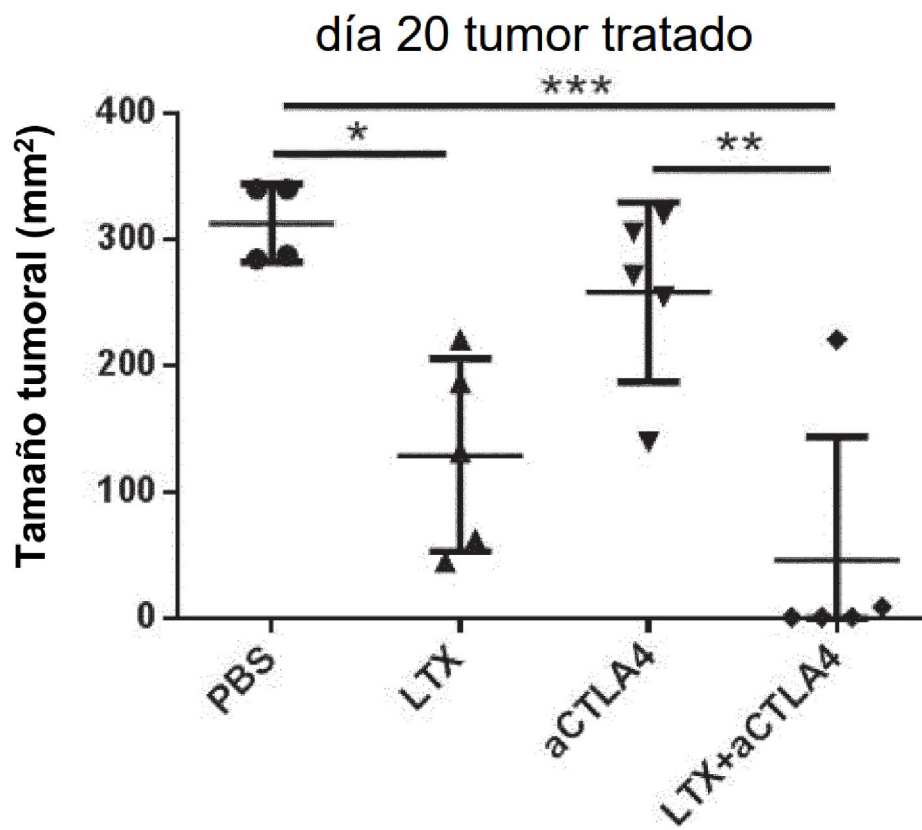


Figura 21

