

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 554**

21 Número de solicitud: 202230039

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**19.01.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.07.2023**

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

**TABERNEO URBIETA, Aránzazu;**  
**OLLAURI IBÁÑEZ, Claudia Casilda;**  
**ÁLVAREZ VÁZQUEZ, Andrea;**  
**GUTIÉRREZ PELAZ, Sara y**  
**JARAÍZ RODRÍGUEZ, Myriam**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **PÉPTIDOS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES**

57 Resumen:

Péptidos y composición farmacéutica para el tratamiento de tumores.

La presente invención se relaciona con péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, con la condición de que dichos péptidos no tienen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ni SEQ ID NO: 3, y una composición farmacéutica de los mismos. Además, la invención también se relaciona con sus usos en el tratamiento de tumores, en particular, en el tratamiento de cáncer y metástasis.

ES 2 946 554 A1

## DESCRIPCIÓN

### Péptidos y composición farmacéutica para el tratamiento de tumores

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina. En concreto, la presente invención se refiere a péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, con la condición de que dichos péptidos no tienen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ni SEQ ID NO: 3, y una composición farmacéutica de los mismos. Además, la invención también se relaciona con sus usos  
10 en el tratamiento de tumores, en particular, en el tratamiento de cáncer y metástasis.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La actividad de la oncoproteína c-Src es especialmente alta en el glioblastoma, el tumor cerebral primario más agresivo, que cuenta con una supervivencia inferior a 2 años tras el diagnóstico. Gracias a la actividad de c-Src, las células madre de glioblastoma, responsables de la recurrencia y, por ende, la letalidad de este tumor, son capaces de sobrevivir, proliferar, mantener el fenotipo de célula madre e invadir el tejido sano adyacente. c-Src interacciona con sus ligandos a través de su dominio SH3 que se une  
20 a regiones ricas en prolina dentro de su proteína diana.

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

30 La solicitud WO2014191608 describe el desarrollo de un péptido penetrante que contiene la secuencia 266-283 de la conexina-43 (Cx43) fusionada a la secuencia penetrante TAT (TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, y se demuestra que TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, que comprende la región canónica de unión a SH3, se une a c-Src y a sus inhibidores endógenos CSK y PTEN. La unión de c-Src a sus inhibidores en esta región provoca la inhibición de la actividad de c-Src (González-Sánchez A. *et al.*, Oncotarget, 7(31):49819-49833 (2016);  
35

Jaraíz-Rodríguez M. *et al.*, J Vis Exp., (130):56457 (2017)) y su consiguiente efecto antitumoral.

Asimismo, TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, al igual que la Cx43, es capaz de inhibir la actividad de c-Src y los procesos protumorales que de ella dependen (Herrero-González, S. *et al.*, Oncogene, 29(42):5712-23 (2010); Gangoso, E. *et al.*, Cell Death Dis., 5(1):e1023 (2014)), induciendo así un potente efecto antitumoral en células madre de glioblastoma humano y de ratón (Jaraíz-Rodríguez, M. *et al.*, Stem Cell Reports 9, 451-463 (2017)), tanto *in vitro* como *in vivo*, sin afectar a las células sanas del cerebro (Jaraíz-Rodríguez, M. *et al.*, Neuro-Oncology, 22, 493-504 (2020)).

Sin embargo, en el desarrollo de moléculas con potencial terapéutico, un parámetro importante a tener en cuenta es el tamaño de las mismas, debido a que, por lo general, un mayor tamaño está relacionado con una peor permeabilidad de membranas, inestabilidad metabólica, mayores costes o peor biodisponibilidad. Así, en vista a lo expuesto anteriormente, hay en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar compuestos de menor tamaño alternativos a los ya existentes, con efecto antitumoral y/o capaces de revertir el fenotipo de células madre tumorales.

## 20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Tal como se ha explicado en los antecedentes, es conocido que la conexina-43 (Cx43) revierte el fenotipo de las células madre de glioma humano y que dicho efecto reside en una porción del extremo carboxilo terminal de la Cx43.

En la presente invención, los inventores han identificado que secuencias de aminoácidos aún más cortas de la Cx43 son capaces de mantener, e incluso mejorar ligeramente, el efecto antitumoral en células madre tumorales. En particular, los inventores han demostrado que la secuencia 266-275 de la Cx43 (SEQ ID NO: 1), y péptidos que comprenden dicha secuencia, como los péptidos que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, reducen la proliferación y supervivencia celular (Fig. 5 y 6), así como la migración celular (Fig. 7) de células madre tumorales, tales como las células madre de glioma.

Así, las secuencias de aminoácidos de los péptidos de la invención mantienen e incluso

incrementan ligeramente su efecto antitumoral, a pesar de que respecto a la SEQ ID NO: 3 (Cx43<sub>266-283</sub>), se han eliminado residuos pertenecientes a la región canónica rica en prolinas de la Cx43, comprendida entre los aminoácidos 274-283, responsable de la unión al dominio SH3 de c-Src.

5

Estos dominios SH3 (del inglés, *Src homology 3*), están involucrados en la regulación de importantes rutas celulares, como proliferación o migración celular, procesos cuya desregulación está íntimamente relacionada con el desarrollo de tumores. Generalmente, la unión de c-Src a sus inhibidores en esta región provoca la inhibición de la actividad de c-Src y su consiguiente efecto antitumoral. Sin embargo, a pesar de que los estudios estructurales previos indicaban que la región canónica de unión al dominio SH3 de c-Src en la Cx43 (274-283) era clave para el efecto antitumoral del péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, los inventores han demostrado que el efecto antitumoral reside en la secuencia comprendida entre los aminoácidos 266-275 de la Cx43 (SEQ ID NO: 1). De hecho, los resultados muestran la presencia de aminoácidos críticos para el efecto antitumoral de la proteína Cx43 en dicha SEQ ID NO: 1 (Figs. 1 a 4).

10  
15

El desarrollo de péptidos con secuencias de aminoácidos más cortas, que tengan capacidad antiproliferativa y de reducción de migración celular (como en el caso de los péptidos de la presente invención), presenta como ventajas asociadas una solubilización más alta, plegamientos más sencillos y mejora de su internalización celular, favoreciendo su administración en el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular o en las que hay implicadas células madre tumorales, tales como cáncer, incluyendo cáncer metastásico. Además, disponer de péptidos más cortos, previene la aparición de efectos no deseados por interacción del resto de la Cx43 con otros efectores celulares. Por último, una ventaja añadida asociada al empleo de péptidos de la presente invención radica en que es posible unir secuencias de internalización celular a los péptidos para que, cuando son administrados a un sujeto, estos puedan internalizarse en la célula para ejercer su efecto sin necesidad de emplear técnicas de terapia génica.

20  
25  
30

En base a esto, los inventores han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos a continuación:

Péptidos de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un péptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (Cx43<sub>266-275</sub>) [AYFNGCSSPT], de aquí en  
5 adelante el “péptido de la invención”, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ni la SEQ ID NO: 3 (Cx43<sub>266-283</sub>; péptido descrito en WO2014191608).

La secuencia SEQ ID NO: 2 presenta la secuencia de aminoácidos y corresponde al  
10 extremo carboxilo terminal de la Cx43 (Cx43CT)  
SPSKDCGSPKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVGTGDRNNSSCRNYNKQASEQN  
WANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDFPDDNQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSS  
RASSRASSRPRPDDLEI

15 La secuencia SEQ ID NO: 3 presenta la secuencia de aminoácidos  
AYFNGCSSPTAPLSPMSP.

Tal como se ha explicado previamente, cualquier péptido que contenga en su secuencia de aminoácidos la SEQ ID NO: 1 (Cx43<sub>266-275</sub>), tiene la capacidad de revertir el fenotipo  
20 de una célula madre tumoral y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, de inhibir la proliferación celular de una célula madre tumoral, así como reducir la migración celular.

Los inventores, además, han demostrado experimentalmente que otros péptidos que  
25 comprenden la SEQ ID NO: 1, presentan también este efecto. Así, en una realización particular, el péptido de la invención comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 (Cx43<sub>266-277</sub>) [AYFNGCSSPTAP].

En otra realización particular, el péptido de la invención comprende, o consiste en, la  
30 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 (Cx43<sub>266-279</sub>) [AYFNGCSSPTAPLS].

En otra realización particular, el péptido de la invención comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 (Cx43<sub>266-281</sub>) [AYFNGCSSPTAPLSPM].

35 En el contexto de la presente invención se entiende por péptido a aquella molécula

formada por la unión de entre 6 y 150 aminoácidos mediante enlaces peptídicos. No obstante, en una realización particular, el péptido de la invención tiene una longitud de 10 a 100 aminoácidos (incluyendo los extremos), más en particular de 10 a 50 aminoácidos (incluyendo los extremos), de 10 a 40 aminoácidos (incluyendo los extremos), de 10 a 30 aminoácidos (incluyendo los extremos) o de 10 a 20 aminoácidos (incluyendo los extremos). En una realización aún más particular, el péptido de la invención tiene una longitud de 10 a 16 aminoácidos (incluyendo los externos). Como entiende un experto en la materia, cuanto más pequeño sea el péptido, más fácil será su administración y presentará menos efectos secundarios.

El péptido de la invención puede obtenerse por técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica. Ejemplos de técnicas de obtención de péptidos incluyen, sin limitar a, síntesis química o biológica, recombinación genética o expresión de polinucleótidos codificantes para el péptido de la invención.

Adicionalmente, los extremos carboxilo y amino terminal del péptido de la invención pueden estar protegidos contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo amino terminal puede estar en forma de grupo acetilo y/o el extremo carboxilo terminal puede estar en forma de grupo amida. También cabe la posibilidad de llevar a cabo modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis, por ejemplo, en el que al menos un puente peptídico  $-\text{CONH}-$  se modifica y reemplaza por un enlace reducido ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), un enlace retroinverso ( $\text{NHCO}$ ), un enlace oximetileno ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), un enlace tiometileno ( $\text{CH}_2\text{-S}$ ), un enlace cetometileno ( $\text{CO-CH}_2$ ), un enlace hidroxietileno ( $\text{CHOH-CH}_2$ ), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace  $-\text{CH=CH}-$ . Los aminoácidos del péptido de la invención pueden estar en configuración D, que pueden dar lugar a péptidos resistentes a proteólisis. Los péptidos también pueden estabilizarse por cruzamiento intramolecular, por ejemplo, mediante la modificación al menos de dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales de oleofin, preferiblemente, cadenas alquénico C3-C8, preferiblemente, cadenas pentel-2-il, seguidas de un entrecruzamiento de las cadenas tal como se describe en la tecnología denominada "staple" (Walensky *et al.*, 2004, Science 205: 1466-1470). Todos estos péptidos modificados de forma química para resistir a la proteólisis también están contemplados dentro de la presente invención.

Modificaciones adicionales al péptido de la invención comprenden la unión covalente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo carboxilo terminal o a un residuo

de lisina, con la finalidad de disminuir su eliminación urinaria y la dosis terapéutica, y de incrementar la vida media del péptido en el plasma sanguíneo. La vida media del péptido también puede incrementarse mediante la inclusión del péptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para formar microesferas que son empleadas como un sistema de administración de fármacos. Polímeros y copolímeros son, por ejemplo, poli (D, L-lactido-co-glicólico) o PLGA. Las técnicas y procedimientos de cómo fabricar microesferas o nanocápsulas lipídicas para su empleo en la administración de fármacos son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Cualquier otro método de administración de fármacos dirigidos selectivamente a una población tumoral puede ser empleado en el contexto de la presente invención.

Además, es ampliamente conocido en el estado de la técnica el uso de biotina en la distribución y/o direccionamiento (*targeting*) de moléculas a células tumorales debido a que los receptores de biotina se encuentran sobreexpresados en células de este tipo. Por tanto, la unión de moléculas, como por ejemplo péptidos, a biotina, mejora su distribución o direccionamiento a células tumorales. Así, en una realización preferida, el péptido de la invención se encuentra unido a biotina covalentemente.

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

Así, en una realización particular, el péptido de la invención comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% con la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el péptido de la invención comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

5

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

10

15

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

20

En la presente invención se entiende por “secuencia de aminoácidos de internalización celular” o “secuencia de internalización celular” o “péptidos de penetración celular” (CPPs) a las secuencias de aminoácidos que poseen la habilidad de transportar moléculas a través de la membrana plasmática, sin pérdida de su integridad. Entre las secuencias más empleadas se encuentran TAT, Antennapedia (Antp) y oligo-argininas, cuya característica en común es la presencia de grupos de aminoácidos catiónicos. Estas secuencias de internalización permiten la internalización del péptido directamente a la célula.

25

Ejemplos de secuencias de internalización celular incluyen, pero no se limitan a, RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 12), VKKKIKREIKI (SEQ ID NO: 13) [Guerignon J, *et al.* 2006. Mol Pharmacol. 69(4): 1115-24], FFLIPKG (SEQ ID NO: 14) [Ueda *et al.* 2012. Biomaterials, 35: 9061], SMCs [Okuyama *et al.*, 2007. Nature Methods, 4, 153 - 159], YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7), DSLKSYWYLQKFSWR (SEQ ID NO: 15), KLWMRWWSPTRRYG (SEQ ID NO: 16), RLWMRWYSPWTRRWG (SEQ ID NO: 17),

30

35

RLIMRIYAPTTRRYG (SEQ ID NO: 18), RLYMRYYSPTTRRYG (SEQ ID NO: 19),  
 RLWMRWYSPRTRAYG (SEQ ID NO: 20), KRPTMRFRYTWNPMK (SEQ ID NO: 21),  
 WKCRRQCFRVLHHWN (SEQ ID NO: 22), WKCRRQAFRVLHHWN (SEQ ID NO: 23),  
 WKARRQAFRVLHHWN (SEQ ID NO: 24), la secuencia penetrante en células de glioma  
 5 (Berges *et al.* Plos One 2012; 7(11):e49436) y Biotin-  
 YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH2 (SEQ ID NO: 25).

En una realización particular, la secuencia de internalización celular comprende, o  
 consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 (YGRKKRRQRRR). A lo largo  
 10 del presente documento, también se emplea el término “secuencia TAT” o “TAT” para  
 hacer referencia a la SEQ ID NO: 7.

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

Así, en la presente invención, los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:  
 5 y SEQ ID NO: 6, pueden encontrarse unidos a una secuencia de internalización  
 20 celular.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende, o consiste en, la  
 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO:  
 11.

25

SEQ ID NO: 8 - YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPT

SEQ ID NO: 9 - YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAP

SEQ ID NO: 10 - YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLS

SEQ ID NO: 11 - YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPM

30

Como ya se ha explicado previamente, en la presente invención nos referimos con  
 “péptido de la invención” a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ  
 ID NO: 1, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos  
 SEQ ID NO: 2 ni la SEQ ID NO: 3. De esta forma, un péptido que comprende la  
 35 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:

6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, así como sus variantes, está englobado bajo el término "péptido de la invención" o "péptidos de la invención", términos usados indistintamente en el presente documento.

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

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

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

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

Un promotor, o región promotora, es una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen determinado (secuencias nucleotídicas). En la presente  
30 invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción del polinucleótido de la invención. Las secuencias promotoras pueden ser unidireccionales o bidireccionales. Un promotor unidireccional es aquel que controla la transcripción de un gen o de más genes que se sitúan en tándem con el primero. "En tándem" se refiere a que el extremo 3' del primer gen va seguido, bien consecutivamente o separados por  
35 una determinada secuencia nucleotídica, por el extremo 5' del segundo gen. Un

promotor bidireccional se refiere a la región promotora que controla la transcripción en dos direcciones opuestas, por ejemplo la secuencia que precede al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 que actúa como promotor bidireccional. Es decir, que un promotor bidireccional dirige la transcripción de dos genes situados de manera divergente, es decir en sentido opuesto, estando el extremo 5' de ambas secuencias nucleotídicas más cercano entre sí que el extremo 3'. En la presente invención se utilizan los términos "promotor" y "región promotora" indistintamente. Además, los promotores en la presente invención pueden ser constitutivos o inducibles. El término "inducible", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de que el promotor tenga un elemento de control que permita activar o desactivar (reprimir) la transcripción del gen que regula, en presencia de un factor externo al promotor.

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

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

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

Como entiende un experto en la materia, el tipo de vector utilizado puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación o un vector de expresión. Así, ejemplos de vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitar a, vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFVHis, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER HCMV, pUB6N5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.

En una realización particular, el vector de la invención es un vector viral, preferiblemente, un vector viral de un retrovirus, un lentivirus o un adenovirus.

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

Por tanto, otro aspecto de la invención se relaciona con una célula, de aquí en adelante la "célula de la invención", que comprende el polinucleótido, la construcción génica o el vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o un vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular,

dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

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

Los inventores han identificado que el péptido de la invención es capaz de revertir el  
 fenotipo de células madre tumorales y/o de inhibir la proliferación celular, en particular,  
 inhibir la proliferación de células madre tumorales, tales como las células madre de  
 25 glioma, así como reducir su migración celular. Asimismo, el péptido, el polinucleótido, la  
 construcción génica, el vector o la célula de la invención, pueden formar parte de una  
 composición, preferiblemente una composición farmacéutica, como agente o principio  
 activo.

30 Así, otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de aquí en adelante, la  
 “composición de la invención”, que comprende el péptido, el polinucleótido, la  
 construcción génica, el vector o la célula de la invención. En una realización particular,  
 la composición de la invención es una composición farmacéutica.

35 En una realización particular, la composición de la invención comprende el péptido, el

polinucleótido, la construcción génica, el vector o la célula de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, y un vehículo que, en caso de una composición farmacéutica, será un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En la presente invención se entiende por "composición farmacéutica" a toda preparación o forma farmacéutica, cuya fórmula de composición expresada en unidades del sistema internacional, está constituida por una sustancia o mezcla de sustancias, con peso, volumen y porcentajes constantes, elaborada en laboratorios farmacéuticos legalmente establecidos, envasada o etiquetada para ser distribuida y comercializada como eficaz  
10 para diagnóstico, tratamiento, mitigación y profilaxis de una enfermedad, anomalía física o síntoma, o el restablecimiento, corrección o modificación del equilibrio de las funciones orgánicas de los seres humanos y de los animales. La elaboración de la composición farmacéutica puede llevarse por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica.

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

25 El término "vehículo" se refiere a un diluyente o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.  
30 Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Preferiblemente, en el caso de los vehículos farmacéuticos, éstos están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida  
35 en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Los

vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según  
5 métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica.

Además, en la presente invención, se contempla que los péptidos de la invención puedan estar asociados a sistemas de distribución o vehículos moleculares, incluyendo sin limitar a, exosomas y microvesículas. Estos sistemas de distribución o vehículos  
10 moleculares son capaces gracias a sus propiedades de atravesar las membranas celulares y entregar su “carga”, en la presente invención los péptidos de la invención, en forma biológicamente activa, y además, pueden atravesar membranas biológicas como la barrera hematoencefálica. Así, en una realización preferida, la composición de la invención además comprende exosomas y/o microvesículas.

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

Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender un adyuvante. Por "adyuvante" se entiende cualquier sustancia que intensifica la efectividad de la composición farmacéutica de la invención. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, sin  
5 limitar a, adyuvantes formados por sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio, formulaciones de emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite como el Adyuvante Completo de Freund (ACF) así como el Adyuvante Incompleto de Freund (AIF), geles minerales; copolímeros en bloque, Avridine™, SEAM62, adyuvantes formados por componentes de la pared celular  
10 de bacterias como adyuvantes que incluyan liposacaridos (P.ej. lípido A o Lípido A monofosforil (MLA), trealosa dimicolato (TDM), y componentes del esqueleto de la pared celular (CWS), proteínas *heat shock* o sus derivados, adyuvantes derivados de toxinas bacterianas ADPribosilatinadas, que incluyen toxina de difteria (DT), toxina pertusis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas de *E.coli* lábiles al calor (LT1 y LT2), Endotoxina  
15 A y exotoxina de *Pseudomonas*, exoenzima B de *B.cereus*, toxina de *B. sphaerius*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum* así como las toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriforma* and *C. diffieile*, *S. aureus*, EDIM y mutantes de toxina mutantes como la CRM-197, toxina mutante no toxica de la difteria; saponinas como las ISCOMs (complejos inmunoestimuladores), kemocinas quimioquinas y citoquinas como  
20 la interleuquinas (IL-1 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 12, etc), interferones (como el interferon gama) factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), Factor de necrosis tumoral (TNF), defensinas 102, RANTES, MIPI -.alpha,y MEP-2, péptidos muramil como los N- acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L- alanyl-  
25 Disoglutaminyl- L-alanine-2-( 1 '-2'-dipalmitoyl-s- n-glycero-3 huydroxyphosphoryloxy)ethylamine (MTP-PE) etc; adyuvantes derivados de la familia de moléculas CpG, CpG dinucleótidos y oligonucleótidos sintéticos que comprendan motivos CpG, lisosum exoenzima de *C. Limosum* y adyuvantes sintéticos como PCPP, la toxina del cólera, toxina de Salmonella, alumbre y similares, hidróxido de aluminio, N-  
30 acetil-muramil-Ltreonil- D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanyl-D-isoglutamina, MTP-PE y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno a12%/Tween 80. Otros ejemplos de adyuvantes incluyen DDA (bromuro de dimetildiocetadecilamonio), adyuvantes completo  
35 e incompleto de Freund, QuilA, microvesículas y exosomas.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que el vehículo o el excipiente deben permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, en particular de la partícula de la invención, es decir, que sea compatible con dichos  
 5 componentes, de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

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

Por "agente quimioterapéutico", se entiende cualquier sustancia que es capaz de inhibir la proliferación celular sin matar a la célula necesariamente, o que es capaz de inducir la muerte celular. Los agentes capaces de inhibir la proliferación celular sin provocar muerte celular se denominan de forma genérica, agentes citostáticos, mientras que  
 15 aquellos que son capaces de inducir la muerte celular normalmente mediante la activación de la apoptosis se denominan de forma genérica agentes citotóxicos. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen (i) agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos, paclitaxel, docetaxel, epothilonas y laulimalides, (ii) inhibidores de  
 20 quinasas tales como Iressa(R), Gleevec, Tarceva™, (Erlotinib HCl), BAY-43-9006, (iii) anticuerpos específicos para receptores con actividad quinasa incluyendo, sin limitación, Trastuzumab (Herceptin(R)), Erlotinib, Gefitinib, Cetuximab (Erbix(R)), Bevacizumab (Avastin™), Rituximab (ritusan(R)), Pertuzumab (Omnitarg™); (iv) inhibidores de la ruta mTOR, tales como rapamicina y CCI-778; (v) Apo2L1Trail, (vi) agentes anti-angiogénicos  
 25 tales como endostatina, combrestatina, angiostatina, trombospondina y el inhibidor del crecimiento endothelial vascular (VEGI); (vii) vacunas antineoplásicas incluyendo células T activadas, agentes inmunopotenciadores inespecíficos (por ejemplo interferones, interleuquinas) u otros tipos de inmunoterapia; (viii) agentes citotóxicos antibióticos tales doxorubicina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, epirubicina,  
 30 mitomicina y mitozantrona; (ix) agentes alquilantes tales como Melphalan, Carmustina, Lomustina, ciclofosfamida, ifosfamida, Clorambucilo, Fotemustine, Busulfano, Temozolomida y thiotepa; (x) agentes hormonales antineoplásticos tales como Nilutamida, acetato de ciproterona, anastrozol, Exemestano, Tamoxifeno, Raloxifeno, Bicalutamida, Aminoglutetimida, acetato de leuprorelina, citrato de Toremifeno, Letrozol,  
 35 Flutamida, acetato de Megestrol y acetato de goserelina; (xi) hormonas gonadales tales

como acetato de ciproterona y acetato de medoxiprogesterone; (xii) antimetabolitos tales como Citarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Topotecano, Hidroxyurea, Tioguanina, Metotrexato, Colaspasa, Raltitrexedo y capicitabina; (xiii) agentes anabólicos tales como nandrolone; (xiv) hormonas adrenales esteroideas tales como acetato de metilprednisolona, dexametasone, hidrocortisona, prednisolona y prednisona; (xv) agentes antineoplásicos tales como Temozolamida, Carboplatino, Cisplatino, Oxaliplatino, Etoposido and Dacarbazina e (xvi) inhibidores de topoisomerasa tales como topotecana e irinotecano.

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

## 20 Usos terapéuticos de la invención

Como se ha explicado previamente, el péptido de la invención, así como los aspectos asociados al mismo, el polinucleótido, la construcción génica, el vector, la célula de la invención, son capaces de revertir el fenotipo de células madre tumorales y/o de inhibir  
25 la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre tumorales, tales como las células madre de glioma, así como reducir su migración celular. Asimismo, el péptido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector o la célula de la invención puede formar parte de una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, siendo el agente o principio activo, teniendo aplicación en el tratamiento  
30 de tumores o cáncer presentes en un sujeto.

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

35

Así, otro aspecto de la invención se refiere al péptido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector, la célula o la composición de la invención para su uso como medicamento.

5 El término "medicamento", tal y como se usa en el presente documento, hace referencia a cualquier composición/sustancia usada para la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento o la curación de enfermedades en un sujeto o que pueda administrarse al sujeto con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

10

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

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

En la presente invención se entiende por "tumor" a todo crecimiento de un tejido por la proliferación incontrolada de células. El tumor puede ser benigno o maligno. Se  
20 considera que un tumor es benigno cuando las células que forman el tumor no invaden otros tejidos ni causan metástasis en otras partes del cuerpo. Normalmente, el tumor benigno está bien encapsulado y las células no presentan cambios de estructura. Por el contrario, se considera que un tumor es maligno cuando las células que forman el tumor pueden crecer rápidamente, presentan anaplasia de forma habitual y son capaces de  
25 invadir tejidos adyacentes, e incluso dispersarse a otras partes del cuerpo, proceso conocido como metástasis. En general, los tumores malignos se conocen como cáncer. Así, en una realización particular, el tumor maligno es cáncer que, en otra realización más particular, es un cáncer metastásico.

30 Por otro lado, el tumor o cáncer (en caso de que sea maligno) puede estar localizado u originarse en cualquier tejido u órgano del cuerpo. Así, cualquier tumor o cáncer es susceptible de ser tratado con la composición farmacéutica de la invención, independientemente de su estado de desarrollo, su origen o su localización. Ejemplos de cáncer incluyen, sin limitar a, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel,  
35 cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer

de hígado o cáncer de cuello de útero. No obstante, en una realización particular, el tumor es un tumor cerebral (benigno o maligno), es decir, está localizado el cerebro.

En otra realización particular, el tumor es un glioma. Tal y como se usa aquí, el término  
5 “glioma” se refiere a un tipo de neoplasia que se produce en el cerebro o en la médula espinal. Se llama glioma, ya que surge a partir de células gliales. Su ubicación más frecuente es el cerebro, aunque también puede presentarse en la médula espinal. En la presente invención, la composición de la invención puede ser usada para el tratamiento de cualquier glioma.

10 Los gliomas son nombrados de acuerdo con el tipo específico de células que más se asemejan, clasificándose en ependimomas (células ependimarias), astrocitomas (astrocitos) y oligodendrogliomas (oligodendrocitos), o según el grado de patología del tumor, pudiendo ser de bajo grado, es decir, los gliomas están bien diferenciados y son  
15 benignos, o de alto grado, esto es, los gliomas son indiferenciados o anaplásicos. Así, en una realización particular, el glioma es un glioma seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma y ependimoma. En una realización aún más particular, el astrocitoma es un glioblastoma multiforme.

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

En una realización aún más particular, las células madre tumorales son células madre de glioma. Ejemplos de células madre de glioma incluyen, sin limitar a, células G166,  
30 células G179, células GliNS2 o células G144 (Pollard S.M. *et al.*, Cell Stem Cell, 4, 568-580 (2009)), en general células madre de glioma primarias obtenidas de glioblastomas de pacientes inmediatamente después de la cirugía o células madre de glioblastoma murinas. Así, en una realización particular, las células madre de glioma se seleccionan de la lista que consiste en células G166, células G179, células GliNS2 y células G144.  
35 Preferiblemente, las células madre de glioma son células G166.

Como se ha explicado previamente, el péptido de la invención, así como los aspectos asociados al mismo, el polinucleótido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector o la célula de la invención, que pueden formar parte y ser el agente o principio activo de una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, son capaces de revertir el fenotipo de células madre tumorales y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre tumorales, tales como las células madre de glioma, así como reducir su migración celular.

Así, un aspecto de la invención se refiere al péptido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector, la célula o la composición de la invención para su uso en la reversión del fenotipo de las células madre tumorales y/o inhibición de la proliferación celular, en particular, inhibición de la proliferación de células madre, más en particular, células madre tumorales, aún más en particular, células madre de glioma.

Además, tal y como se muestra en los ejemplos que ilustran la presente invención, el péptido de la invención reduce la migración de las células madre de glioma humano. La migración de células tumorales es la causa de la invasión de otros tejidos circundantes u otras partes del organismo (metástasis), aumentando la probabilidad de que escapen a la cirugía y causen recurrencia de estos tumores.

Así, otro aspecto de la invención se refiere al péptido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector, la célula o la composición de la invención para su uso en la prevención de la proliferación, migración y/o metástasis de células tumorales. En una realización particular, las células tumorales son células madre. En otra realización aún más particular, las células madre son células madre de glioma.

En una realización particular, las células madre de glioma se seleccionan de la lista que consiste en células G166, células G179, células GliNS2 y células G144. Preferiblemente, las células madre de glioma son células G166.

#### Usos del péptido de la invención, y aspectos derivados del mismo, en la fabricación de un medicamento.

Los inventores han demostrado que el péptido de la invención es capaz de revertir el

fenotipo de células madre tumorales y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre tumorales, tales como las células madre de glioma, así como reducir su migración celular. Esto permite el empleo del péptido de la invención en el tratamiento de tumores o cáncer presentes en un sujeto.

5

Así, en otro aspecto, la invención se refiere al uso del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector o célula de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica. Las técnicas y procedimientos para elaborar composiciones farmacéuticas ya han sido descritos previamente en el presente documento.

10

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

15

Los términos “tratamiento”, “tumor”, “tumor benigno”, o “tumor maligno”, ya han sido definidos o explicados previamente, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas, son aplicables al presente aspecto de la invención.

20

Así, en una realización particular, el tumor maligno es cáncer que, en otra realización más particular, es un cáncer metastásico.

En otra realización particular, el tumor es un tumor cerebral (benigno o maligno), es decir, está localizado el cerebro.

25

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

30

En otra realización particular, el tumor comprende células madre, preferiblemente, células madre tumorales.

35

Como se ha explicado previamente, el péptido de la invención, así como los aspectos asociados al mismo, el polinucleótido, el polinucleótido, la construcción génica, el vector o la célula de la invención, es capaz de revertir el fenotipo de células madre tumorales

y/o de inhibir la proliferación celular, en particular, inhibir la proliferación de células madre tumorales, tales como las células madre de glioma.

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

Además, tal y como se muestra en los ejemplos que ilustran la presente invención, el péptido de la invención reduce la proliferación y migración de las células madre de glioma humano. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector o célula de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para prevenir la proliferación, migración y/o metástasis de células tumorales. En una realización particular, las células tumorales son células madre. En otra realización aún más particular, las células madre son células madre de glioma.

#### Usos *in vitro* del péptido de la invención

Además de las aplicaciones terapéuticas mencionadas más arriba, también es posible la aplicación del péptido de la invención, así como los aspectos inventivos derivados de él, en ensayos *in vitro*. Así, otro aspecto inventivo se refiere al uso del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición de la invención para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o revertir *in vitro* el fenotipo de las células madre. En una realización particular, las células madre son células madre tumorales, más en particular, células madre tumorales de glioma.

En la presente invención se entiende por “revertir el fenotipo de células madre tumorales” a que las células madre tumorales pierdan sus características fenotípicas, es decir, su alto potencial tumorigénico (capacidad de generar tumores malignos) y su resistencia a las terapias convencionales en el tratamiento de tumores. Molecularmente, una célula madre tumoral se caracteriza por la elevada expresión de Id1, Sox2 y N-cadherina, la baja expresión de Cx43 y E-cadherina, y la alta actividad de c-Src. Así, en la presente invención se dice que “un péptido tiene la capacidad de revertir el fenotipo

de células madre tumorales” cuando dicho péptido al entrar en contacto con las células madre tumorales origina que dichas células pierdan las características fenotípicas mencionadas. Ejemplo de un ensayo para comprobar si el fenotipo de una célula madre tumoral ha sido revertido es, por ejemplo, un estudio inmunocitoquímico, por PCR o por Western Blot de la expresión de Id1, Sox2, N-cadherina, E-cadherina o cualquier otro marcador de célula madre.

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

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

En una realización particular de los usos *in vitro* del péptido de la invención, la concentración del péptido de la invención es de 1 a 220  $\mu\text{M}$ . En otra realización más particular, la concentración del péptido de la invención es de 10 a 200  $\mu\text{M}$ . En otra realización aún más particular, la concentración del péptido de la invención es de 40 a 60  $\mu\text{M}$  (incluyendo los valores 40 y 60  $\mu\text{M}$ ). Más en particular, la concentración del péptido de la invención es de 45 a 55  $\mu\text{M}$  (incluyendo los valores 45 y 55  $\mu\text{M}$ ). Aún más en particular, la concentración del péptido de la invención es 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55  $\mu\text{M}$ . Preferiblemente, la concentración del péptido es 50  $\mu\text{M}$ .

#### Kit de la invención

La administración del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición farmacéutica de la invención puede requerir una serie de componentes, que a su vez pueden disponerse juntos en forma de un kit.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante el “kit de la invención”, que comprende el péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición de la invención.

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

El kit de la invención, que tiene utilidad para ser usado en la administración del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición de la invención, también puede emplearse en ensayos *in vitro*.

Así, otro aspecto de la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la determinación *in vitro* del efecto del péptido en la tumorigenicidad de una línea celular, para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o revertir el fenotipo de las células madre tumorales.

En una realización particular del kit de la invención, la inhibición de la proliferación celular comprende la inhibición de la proliferación celular de células madre tumorales, preferiblemente células madre de glioma.

Los términos empleados para definir el kit y usos del kit de la invención ya han sido explicados, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son aplicables a los diferentes usos del kit de la invención

#### Método de tratamiento/prevención de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento y/o la prevención de tumores en un sujeto, tanto benignos como malignos (cáncer), que comprende la administración a dicho sujeto del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula, o composición de la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para la prevención de la proliferación, migración y/o metástasis de células tumorales en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto del péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula, o composición de la invención.

Los términos definidos y explicados para el resto de aspectos de la invención, así como las realizaciones preferidas de los mismos también son aplicables al método de tratamiento y/o prevención de la invención.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Efecto de la cisteína 271 de la secuencia 266-283 de la Cx43 en la supervivencia y proliferación de las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT-Cx43<sub>266-283</sub> o del mismo péptido en el que la cisteína 271 se substituyó por alanina (TAT-Cx43<sub>266-283</sub> C/A), ambos a una concentración de 50  $\mu$ M. A las 48h después del inicio del tratamiento, se tomaron fotomicrografías y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje del control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*p < 0,001 (ANOVA).

**Fig. 2.** Comparación del efecto del péptido TAT-Cx43<sub>271-287</sub> frente a TAT-Cx43<sub>266-283</sub> en la supervivencia y proliferación de las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT-Cx43<sub>266-283</sub> o de TAT-Cx43<sub>271-287</sub>, ambos a una concentración de 50  $\mu$ M. A las 72h después del inicio del tratamiento, se tomaron fotomicrografías y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje del control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*p < 0,001 (ANOVA).

**Fig. 3.** Comparación del efecto del péptido TAT-Cx43<sub>268-283</sub> frente a TAT-Cx43<sub>266-283</sub> en la supervivencia y proliferación de las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT, TAT-Cx43<sub>266-283</sub> o de TAT-Cx43<sub>268-283</sub>, todos a una concentración de 50  $\mu$ M. A las 72h después del inicio del tratamiento, se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje del control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*p < 0,001 y ###p < 0,001 respecto a la condición TAT (ANOVA).

**Fig. 4.** Efecto de la fenilalanina 268 de la secuencia 266-283 de la Cx43 en la supervivencia y proliferación de las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT-Cx43<sub>266-283</sub> o del mismo péptido en el que la fenilalanina 268 se sustituyó por alanina (TAT-Cx43<sub>266-283</sub> F/A), ambos a una concentración de 50 µM. A las 48h después del inicio del tratamiento, se tomaron fotomicrográficas y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los resultados están normalizados frente al control (valor 1) y son medias ± SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*p < 0,001 (ANOVA).

**Fig. 5.** Imágenes representativas del efecto de péptidos penetrantes basados en la Cx43, en los que se han reducido aminoácidos de la región consenso de unión a SH3, en las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT, TAT-Cx43<sub>274-291</sub>, TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, TAT-Cx43<sub>266-281</sub>, TAT-Cx43<sub>266-279</sub>, TAT-Cx43<sub>266-277</sub> y TAT-Cx43<sub>266-275</sub>, todos ellos a una concentración de 50 µM. Se muestran imágenes representativas en contraste de fases de las células al cabo de 48h del inicio del tratamiento. Obsérvese que los péptidos que contienen las secuencias 266-283, 266-281, 266-279, 266-277 y 266-275 de la Cx43 reducen la supervivencia y proliferación de las células madre de glioblastoma humano G166, mientras que los péptidos TAT y TAT-Cx43<sub>274-291</sub> no afectan a la viabilidad y proliferación de estas células cuando se comparan con el control.

**Fig. 6.** Efecto de péptidos penetrantes basados en la Cx43, en los que se han reducido aminoácidos de la región consenso de unión a SH3, en la supervivencia y proliferación de las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT, TAT-Cx43<sub>274-291</sub>, TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, TAT-Cx43<sub>266-281</sub>, TAT-Cx43<sub>266-279</sub>, TAT-Cx43<sub>266-277</sub> y TAT-Cx43<sub>266-275</sub>, todos ellos a una concentración de 50 µM. A las 0, 24, 48 y 72h después del inicio del tratamiento, se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los resultados están normalizados respecto a los valores obtenidos a tiempo 0 (línea punteada de valor 1) y son medias ± SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01 y respecto a la condición TAT-Cx43<sub>266-283</sub> ##p < 0,01 y #p < 0,05 (ANOVA).

**Fig. 7.** Fotogramas representativos del efecto de péptidos penetrantes basados en la

Cx43 en la migración de las células madre de glioblastoma humano G166. Las células madre de glioblastoma humano G166 se trataron en ausencia (control) o presencia de TAT-Cx43<sub>266-283</sub> o TAT-Cx43<sub>266-275</sub>, ambos a una concentración de 50 µM. Se realizaron videos de las células en contraste de fases empleando un microscopio de célula viva.

5 Se muestran 3 fotogramas representativos tomados cada 100 minutos de las células en la situación control, TAT-Cx43<sub>266-283</sub> y TAT-Cx43<sub>266-275</sub>. Se han seleccionado y numerado 3 células en cada condición. Obsérvese que en la situación control los cambios de localización de las células son mayores que en las células tratadas con los péptidos TAT-Cx43<sub>266-283</sub> o TAT-Cx43<sub>266-275</sub>, indicando que estos péptidos afectan a la migración  
10 de las células madre de glioma.

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los  
15 inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la invención.

### 1. Materiales y métodos

#### 1.1. Cultivos de células madre de glioblastoma humano G166

20

Se empleó la línea de células madre de glioblastoma humano G166, obtenida en Biorep, depositada y caracterizada en Pollard *et al.*, Cell Stem Cell., 4(6):568-80 (2009). Estas células se obtuvieron a partir de glioblastoma después de la cirugía y presentan las características de células madre de glioblastoma humano, incluida la capacidad de  
25 autorrenovación, la diferenciación en distintos linajes neurales y tumorigenicidad.

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

## 1.2. Tratamiento con péptidos penetrantes basados en la Cx43.

Se emplearon diferentes péptidos basados en la secuencia 266-283 de la Cx43 fusionados a TAT en su extremo N-terminal, todos ellos a una concentración de 50  $\mu$ M, en medio de cultivo y se analizó su efecto a diferentes tiempos de tratamiento. En paralelo se han analizado estas células en ausencia de tratamiento (control), en presencia del péptido antitumoral TAT-Cx43<sub>266-283</sub> (YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPMSP; que corresponde al péptido descrito en la patente WO2014191608 unido a la secuencia de internalización celular TAT; SEQ ID NO: 35) y de los péptidos sin actividad antitumoral, TAT (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 7) y TAT-Cx43<sub>274-291</sub> (YGRKKRRQRRRPTAPLSPMSPPGYKLVTG; SEQ ID NO: 26).

Las secuencias estudiadas fueron:

- Cx43<sub>266-283</sub> C/A: AYFNGASSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 27)
- Cx43<sub>271-287</sub>: CSSPTAPLSPMSPPGYK (SEQ ID NO: 28)
- Cx43<sub>268-283</sub>: FNGCSSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 29)
- Cx43<sub>266-283</sub> F/A: AYANGCSSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 30)
- Cx43<sub>266-281</sub>: AYFNGCSSPTAPLSPM (SEQ ID NO: 6)
- Cx43<sub>266-279</sub>: AYFNGCSSPTAPLS (SEQ ID NO: 5)
- Cx43<sub>266-277</sub>: AYFNGCSSPTAP (SEQ ID NO: 4)
- Cx43<sub>266-275</sub>: AYFNGCSSPT (SEQ ID NO: 1)

En todos los casos, el estudio se ha realizado con estas secuencias unidas al péptido penetrante YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7):

- TAT-Cx43<sub>266-283</sub> C/A: YGRKKRRQRRRAYFNGASSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 31)
- TAT-Cx43<sub>271-287</sub>: YGRKKRRQRRRCSSPTAPLSPMSPPGYK (SEQ ID NO: 32)
- TAT-Cx43<sub>268-283</sub>: YGRKKRRQRRRFNGCSSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 33)
- TAT-Cx43<sub>266-283</sub> F/A: YGRKKRRQRRRAYANGCSSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 34)
- TAT-Cx43<sub>266-281</sub>: YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPM (SEQ ID NO: 11)
- TAT-Cx43<sub>266-279</sub>: YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLS (SEQ ID NO: 10)
- TAT-Cx43<sub>266-277</sub>: YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAP (SEQ ID NO: 9)
- TAT-Cx43<sub>266-275</sub>: YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPT (SEQ ID NO: 8)

### 1.3. Ensayo de viabilidad colorimétrico con MTT

Para realizar este estudio las células se sembraron a baja densidad y se determinó el número de células viables a diferentes días de tratamiento. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con 300 µL de PBS en presencia de MTT (0,5 mg/mL), durante 75 minutos, en oscuridad, a 37°C, en un incubador de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se retiró el medio, y se añadieron 500 µL de DMSO. Se procedió a agitar las células en oscuridad durante 10 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm.

## 2. Resultados

Los siguientes resultados muestran la existencia de aminoácidos críticos en la región 266-274 para el efecto antitumoral de la Cx43.

En concreto, la cisteína (C) en posición 271 es fundamental para este efecto. Así, la sustitución de esta cisteína por una alanina (A) hace que se pierda el efecto antitumoral (Fig. 1). En la Fig. 1 se puede apreciar cómo la morfología y la viabilidad de las células madre de glioblastoma tratadas con TAT-Cx43<sub>266-283</sub> C/A (TAT-AYFNGASSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 31)) es muy similar a la de las células sin tratamiento (control), mientras que TAT-Cx43<sub>266-283</sub> reduce considerablemente la viabilidad de estas células tumorales. Estos resultados demuestran la relevancia de la cisteína 271 para el efecto antitumoral de la secuencia 266-283 de la Cx43.

Con objeto de determinar si la sola presencia de la cisteína es suficiente para la actividad antitumoral, se analizó el efecto de la secuencia 271-287 que contiene la cisteína 271 y cuyo efecto en la interferencia en el cierre por acidificación de las uniones *gap* formadas por Cx43 ha sido previamente descrito (Calero G., Circ Res., 82(9): 929-35 (1998)). La Fig. 2 muestra que el tratamiento con el péptido TAT-Cx43<sub>271-287</sub> (SEQ ID NO: 32) reduce ligeramente la proliferación de las células madre de glioblastoma, pero su efecto es muy inferior al de TAT-Cx43<sub>266-283</sub>. Estos resultados demuestran que la cisteína 271 es necesaria, pero no suficiente para el efecto antitumoral.

De hecho, la eliminación de los aminoácidos 266 y 267 afecta al efecto antitumoral (Fig. 3). El péptido TAT-Cx43<sub>268-283</sub> (TAT-FNGCSSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 33)) tiene

menos capacidad de reducir la proliferación que TAT-Cx43<sub>266-283</sub> (TAT-AYFNGCSSPTAPLSPMSP), indicando la importancia de los aminoácidos en las posiciones 266 y 267 para el efecto antitumoral de este péptido.

- 5 Por su parte, la sustitución de la fenilalanina (F) por una alanina (A) en la posición 268 (TAT-Cx43<sub>266-283</sub> F/A: TAT-AYANGCSSPTAPLSPMSP (SEQ ID NO: 34)) también reduce el efecto antitumoral. La Fig. 4 muestra cómo el péptido penetrante TAT-Cx43<sub>266-283</sub> F/A afecta a la morfología y viabilidad de las células tumorales, pero en mucha menor medida que el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>.
- 10 Por otro lado, se analizó la relevancia de los aminoácidos en la región consenso, rica en prolinas para el efecto antitumoral. Para ello, se emplearon diferentes péptidos reduciendo la secuencia desde el extremo C-terminal: TAT-Cx43<sub>266-281</sub> (AYFNGCSSPTAPLSPM (SEQ ID NO: 11)), TAT-Cx43<sub>266-279</sub> (AYFNGCSSPTAPLS
- 15 (SEQ ID NO: 10)), TAT-Cx43<sub>266-277</sub> (AYFNGCSSPTAP (SEQ ID NO: 9)), TAT-Cx43<sub>266-275</sub> (AYFNGCSSPT (SEQ ID NO: 8)). Tal y como se aprecia en la Fig. 5, los resultados muestran que los péptidos penetrantes: TAT-Cx43<sub>266-281</sub>, TAT-Cx43<sub>266-279</sub>, TAT-Cx43<sub>266-277</sub> y TAT-Cx43<sub>266-275</sub> reducen la proliferación y supervivencia de las células madre de glioblastoma humano, de forma similar a lo observado con el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>.
- 20 De hecho, el péptido TAT-Cx43<sub>266-275</sub> tiene un efecto antitumoral significativamente superior (Fig. 6). Por su parte, los péptidos penetrantes TAT-Cx43<sub>274-291</sub> (SEQ ID NO: 26) o TAT no producen efectos significativos en las células madre de glioblastoma G166 (Fig. 5 y 6).
- 25 Empleando estos mismos péptidos, pero unidos a biotina, se comprobó que TAT-Cx43<sub>266-281</sub>, TAT-Cx43<sub>266-279</sub>, TAT-Cx43<sub>266-277</sub> y TAT-Cx43<sub>266-275</sub> son capaces de ser internalizados en las células madre de glioblastoma humano de forma similar a TAT-Cx43<sub>266-283</sub>.
- 30 Así mismo, fotogramas tomados a diferentes tiempos en microscopía de célula viva, mostraron que el péptido TAT-Cx43<sub>266-275</sub> reduce la migración de las células madre de glioblastoma humano, de forma similar a lo observado con el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub> (Fig. 7). La migración es la causa de que estas células tumorales invadan el parénquima circundante, escapen a la cirugía y causen la recurrencia de estos tumores, siendo la
- 35 principal causa de mortalidad.

### 3. Conclusiones

- 5 1. La cisteína en la posición 271 de la secuencia 266-283 de la Cx43 es crítica para el efecto antitumoral de esta secuencia, ya que su sustitución por una alanina hace que se pierda dicho efecto.
- 10 2. La cisteína en la posición 271 de la secuencia 266-283 de la Cx43 no es suficiente para el efecto antitumoral, ya que la secuencia 271-287 tiene un efecto muy inferior al presentado por la secuencia 266-283.
- 15 3. Los aminoácidos de las posiciones 266 y 267 de la secuencia 266-283 de la Cx43 son importantes para el efecto antitumoral de esta secuencia, ya que su eliminación hace que se reduzca dicho efecto.
4. La fenilalanina en la posición 268 de la secuencia 266-283 de la Cx43 es importante para el efecto antitumoral de esta secuencia, ya que su sustitución por una alanina hace que se reduzca dicho efecto.
- 20 5. Los aminoácidos de las posiciones 276 a la 283 de la secuencia 266-283 de la Cx43 no son necesarios para el efecto antitumoral de esta secuencia, ya que su eliminación no afecta a dicho efecto.
- 25 6. El péptido TAT-Cx43<sub>266-275</sub> tienen un efecto antitumoral significativamente superior al observado con la secuencia TAT-Cx43<sub>266-283</sub>.

Por tanto, a pesar de que los estudios previos indicaban que la región rica en prolinas de la Cx43 (274-283) era clave para el efecto antitumoral del péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, estos resultados demuestran que el efecto antitumoral reside en la secuencia 266-275 de la Cx43.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicho péptido no tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ni la SEQ ID NO: 3.
2. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.
3. Péptido según la reivindicación 1 o 2, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.
4. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.
5. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido tiene una longitud de 10 a 100 aminoácidos.
6. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el péptido se encuentra covalentemente unido a una secuencia de aminoácidos de internalización celular.
7. Péptido según la reivindicación 6, en donde la secuencia de aminoácidos de internalización celular se encuentra unido al extremo amino terminal del péptido.
8. Péptido según la reivindicación 6 o 7, en donde la secuencia de internalización celular comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.
9. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11.
10. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el péptido se encuentra unido a biotina covalentemente.

11. Un polinucleótido que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones de las reivindicaciones 1 a 10.
- 5 12. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 11.
13. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 11, o una construcción génica según la reivindicación 12.
- 10 14. Vector según la reivindicación 13, en donde el vector es un vector viral, preferiblemente, un vector viral de un retrovirus, un lentivirus o un adenovirus.
- 15 15. Una célula que comprende un polinucleótido según la reivindicación 11, una construcción génica según la reivindicación 12 o un vector según la reivindicación 13 o 14.
- 20 16. Composición que comprende el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un polinucleótido según la reivindicación 11, una construcción génica según la reivindicación 12, un vector según la reivindicación 13 o 14, o una célula según la reivindicación 15.
17. Composición según la reivindicación 16, que además comprende un vehículo y/o un agente quimioterapéutico.
- 25 18. Composición según la reivindicación 16 o 17, en donde la composición está formulada para su administración oral, parenteral, nasal, sublingual o intratumoral.
19. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la composición es una composición farmacéutica.
- 30 20. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, polinucleótido según la reivindicación 11, construcción génica según la reivindicación 12, vector según la reivindicación 13 o 14, célula según la reivindicación 15, o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para su uso como medicamento.
- 35

21. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, polinucleótido según la reivindicación 11, construcción génica según la reivindicación 12, vector según la reivindicación 13 o 14, célula según la reivindicación 15, o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para su uso en el tratamiento de tumores benignos o malignos.
22. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 21, en donde el tumor maligno es cáncer.
23. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 22, en donde el tumor es un tumor cerebral.
24. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 23, en donde el tumor es un glioma.
25. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 24, en donde el glioma es un glioma seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma y ependimoma.
26. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 25, en donde el astrocitoma es un glioblastoma multiforme.
27. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en donde el tumor comprende células madre, preferiblemente, células madre tumorales.
28. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, polinucleótido según la reivindicación 11, construcción génica según la reivindicación 12, vector según la reivindicación 13 o 14, célula según la reivindicación 15, o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para su uso en la prevención de la proliferación, migración y/o metástasis de células tumorales.
29. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 28, en donde las células tumorales son células madre.

30. Péptido, polinucleótido, construcción génica, vector, célula o composición para su uso según la reivindicación 29, en donde las células madre son células madre de glioma.

5 31. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un polinucleótido según la reivindicación 11, una construcción génica según la reivindicación 12, un vector según la reivindicación 13 o 14, una célula según la reivindicación 15, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o revertir el fenotipo de las células madre tumorales.

10

32. Uso según la reivindicación 31, en donde las células madre tumorales son células madre de glioma.

15 33. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un polinucleótido según la reivindicación 11, una construcción génica según la reivindicación 12, un vector según la reivindicación 13 o 14, una célula según la reivindicación 15, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para la identificación *in vitro* de compuestos reguladores o moduladores de la tumorigenicidad.

20

34. Kit que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un polinucleótido según la reivindicación 11, una construcción génica según la reivindicación 12, un vector según la reivindicación 13 o 14, una célula según la reivindicación 15, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

25

35. Uso del kit según la reivindicación 34, para la determinación *in vitro* del efecto del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la tumorigenicidad de una línea celular, o para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o revertir el fenotipo de las células madre tumorales.

30

36. Uso según la reivindicación 35, en donde la inhibición de la proliferación celular comprende inhibición de la proliferación celular de células madre tumorales, preferiblemente células madre de glioma.

35

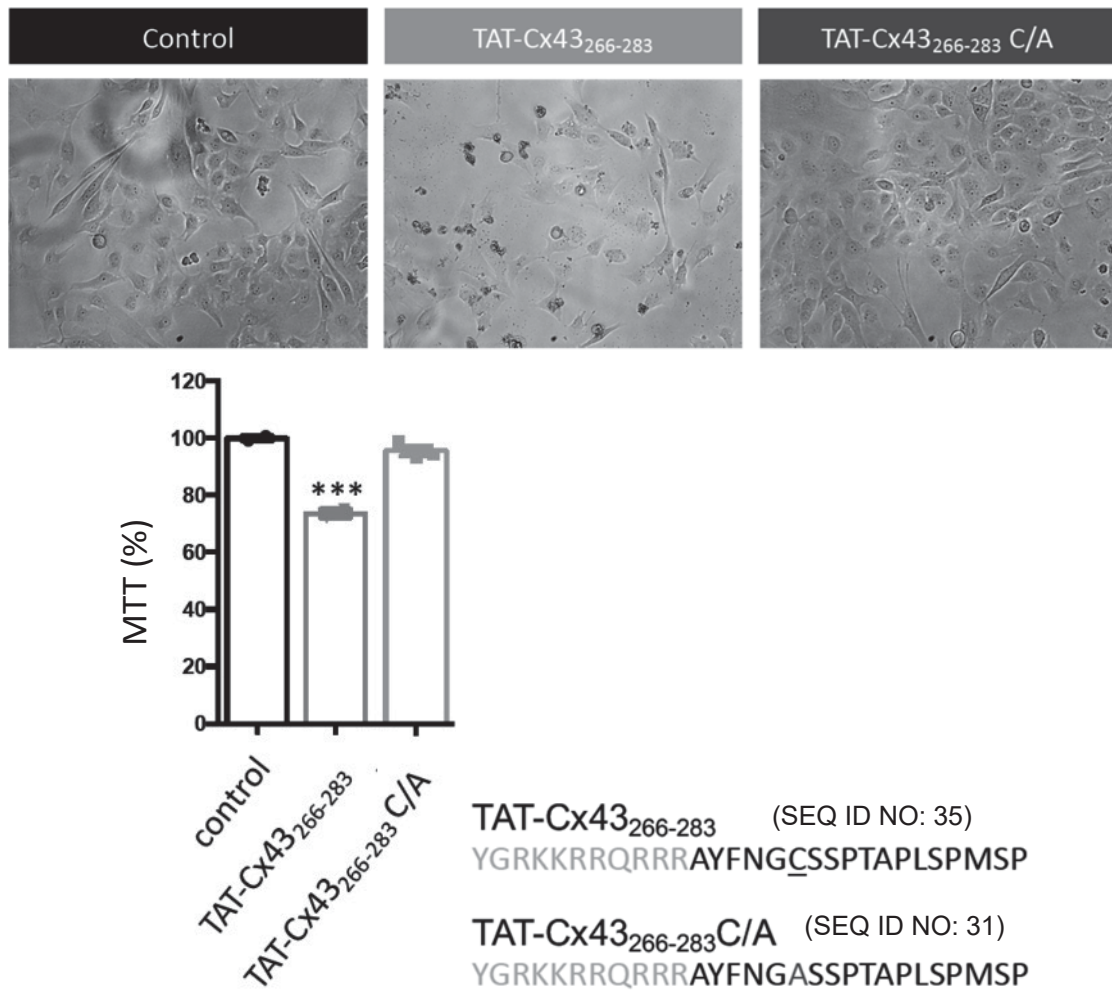


Fig. 1

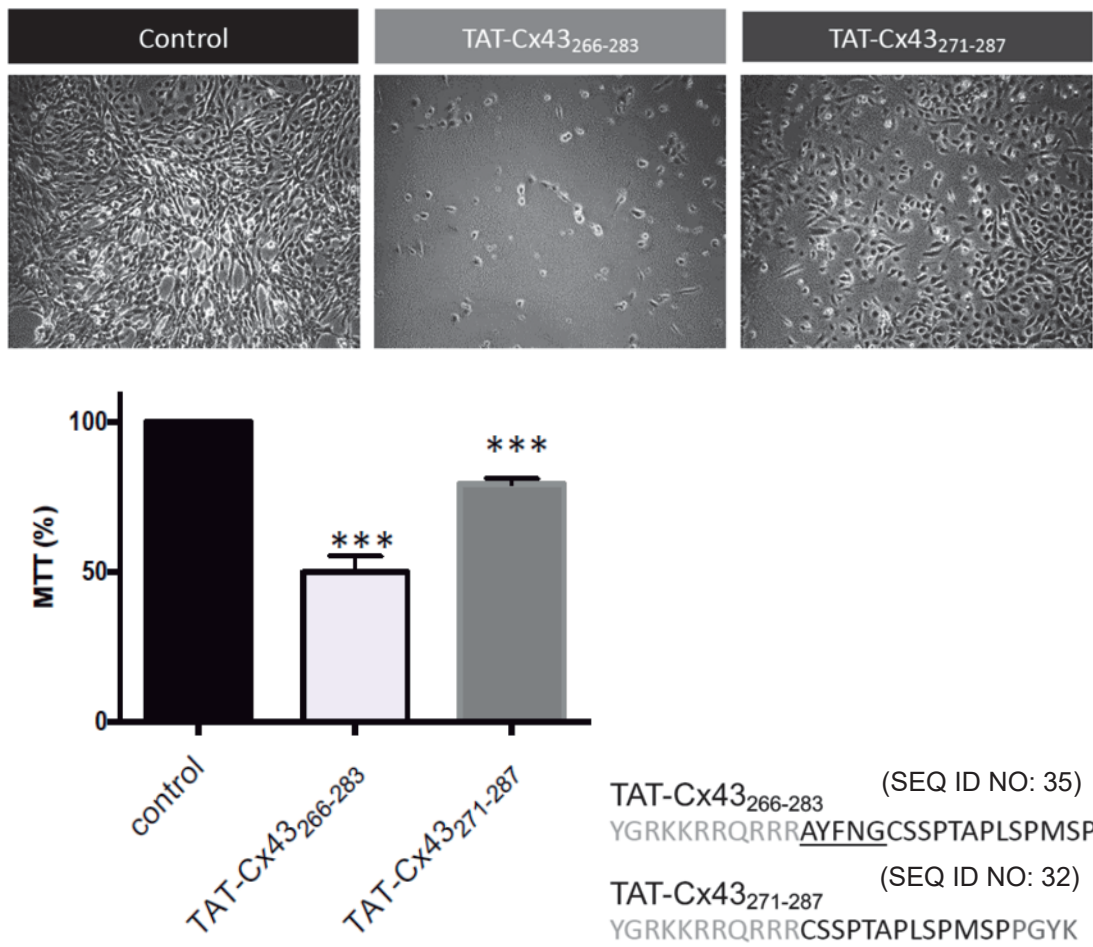


Fig. 2

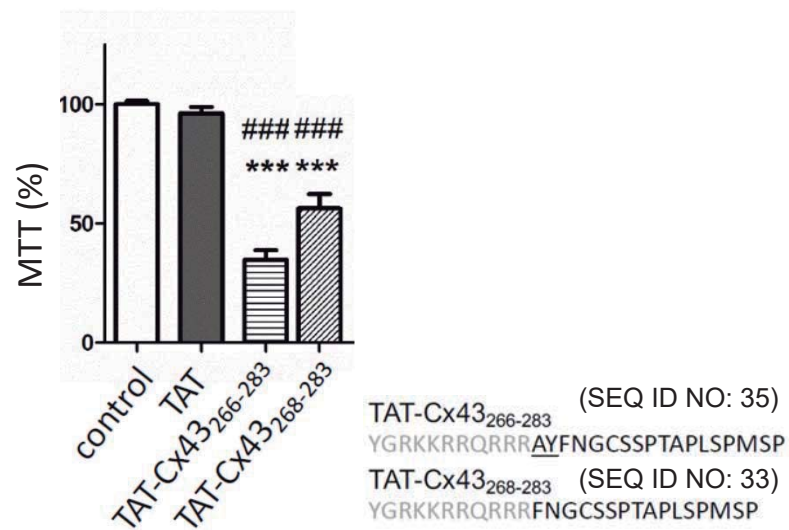


Fig. 3

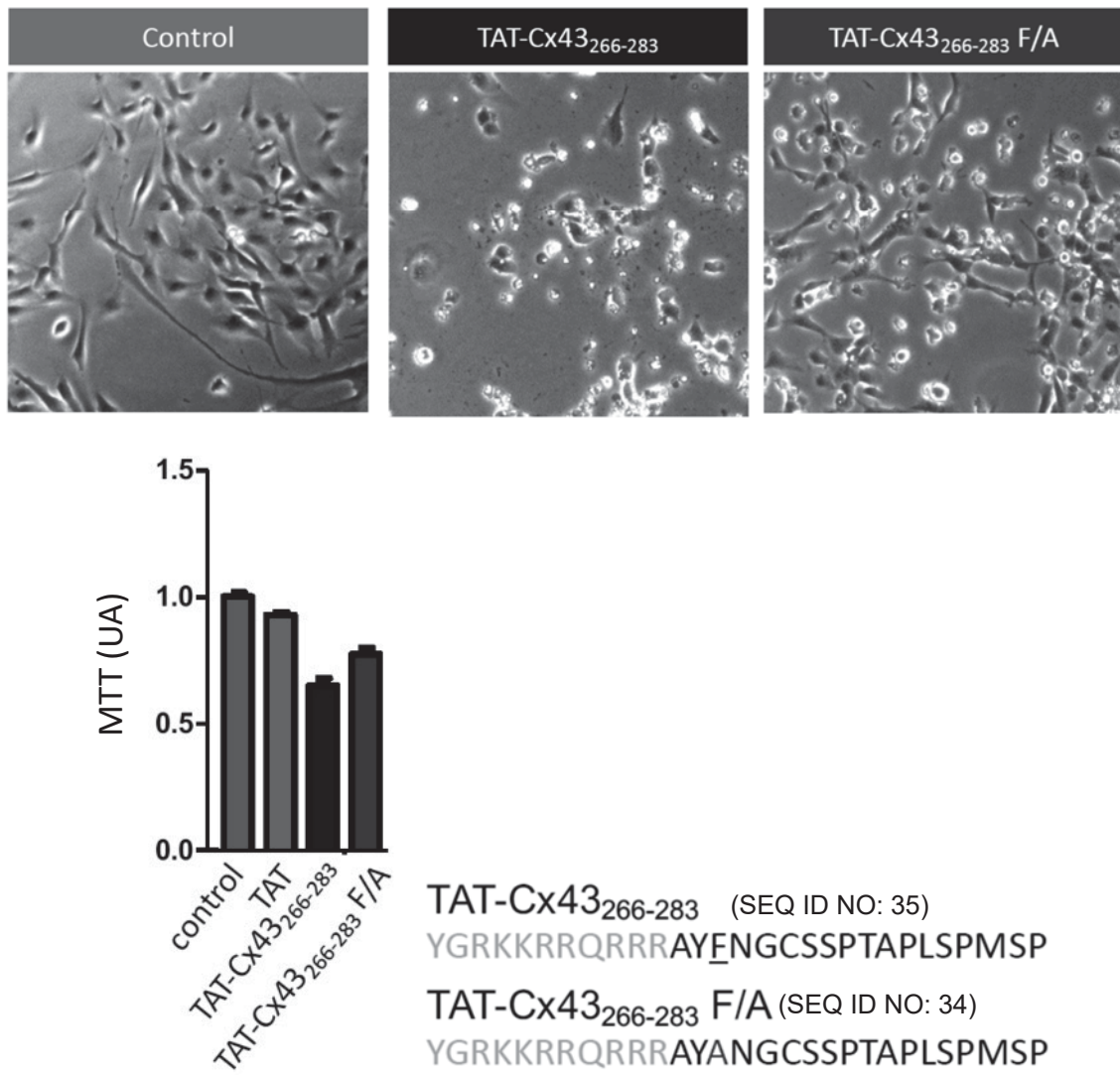


Fig. 4

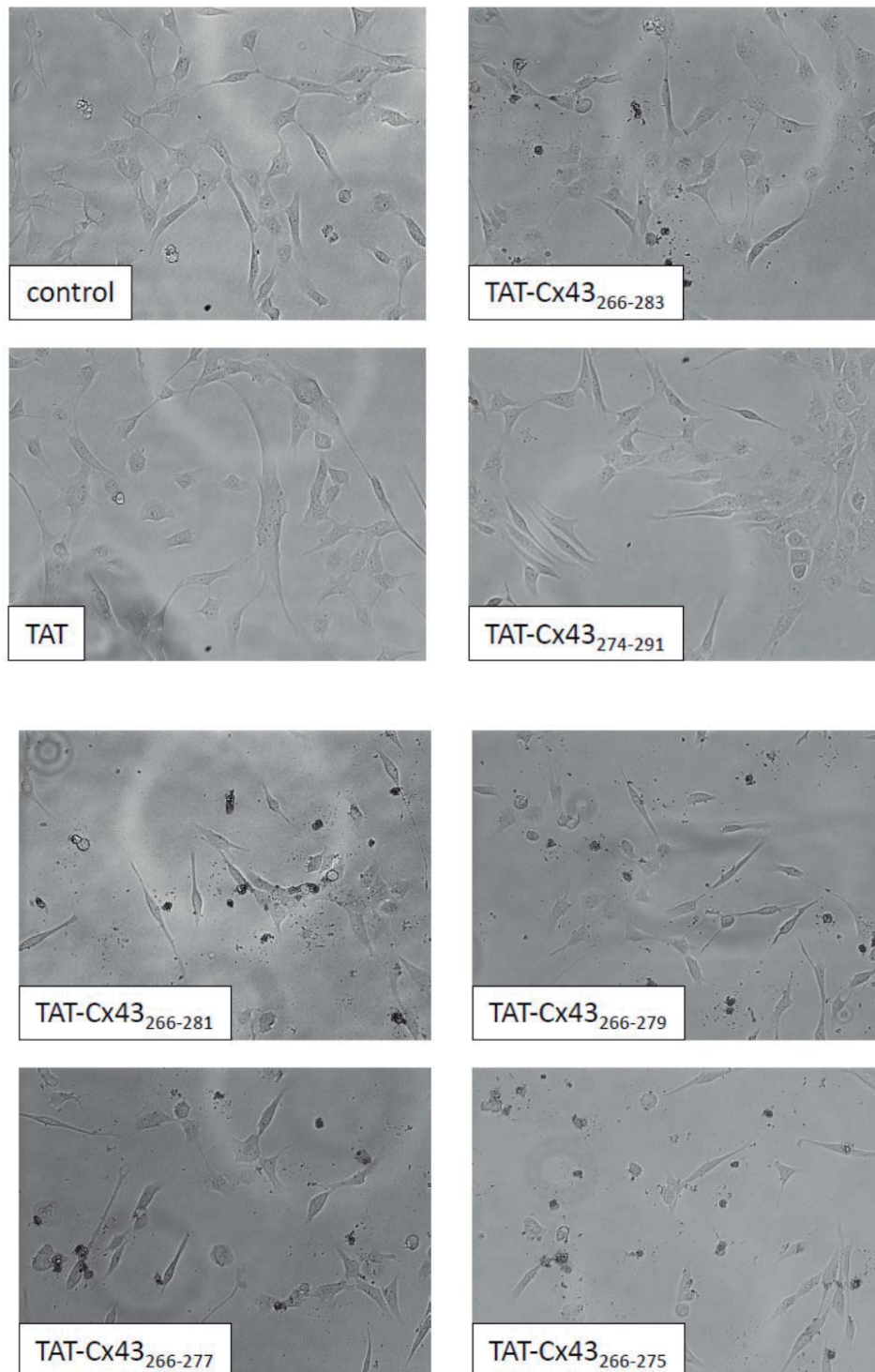


Fig. 5

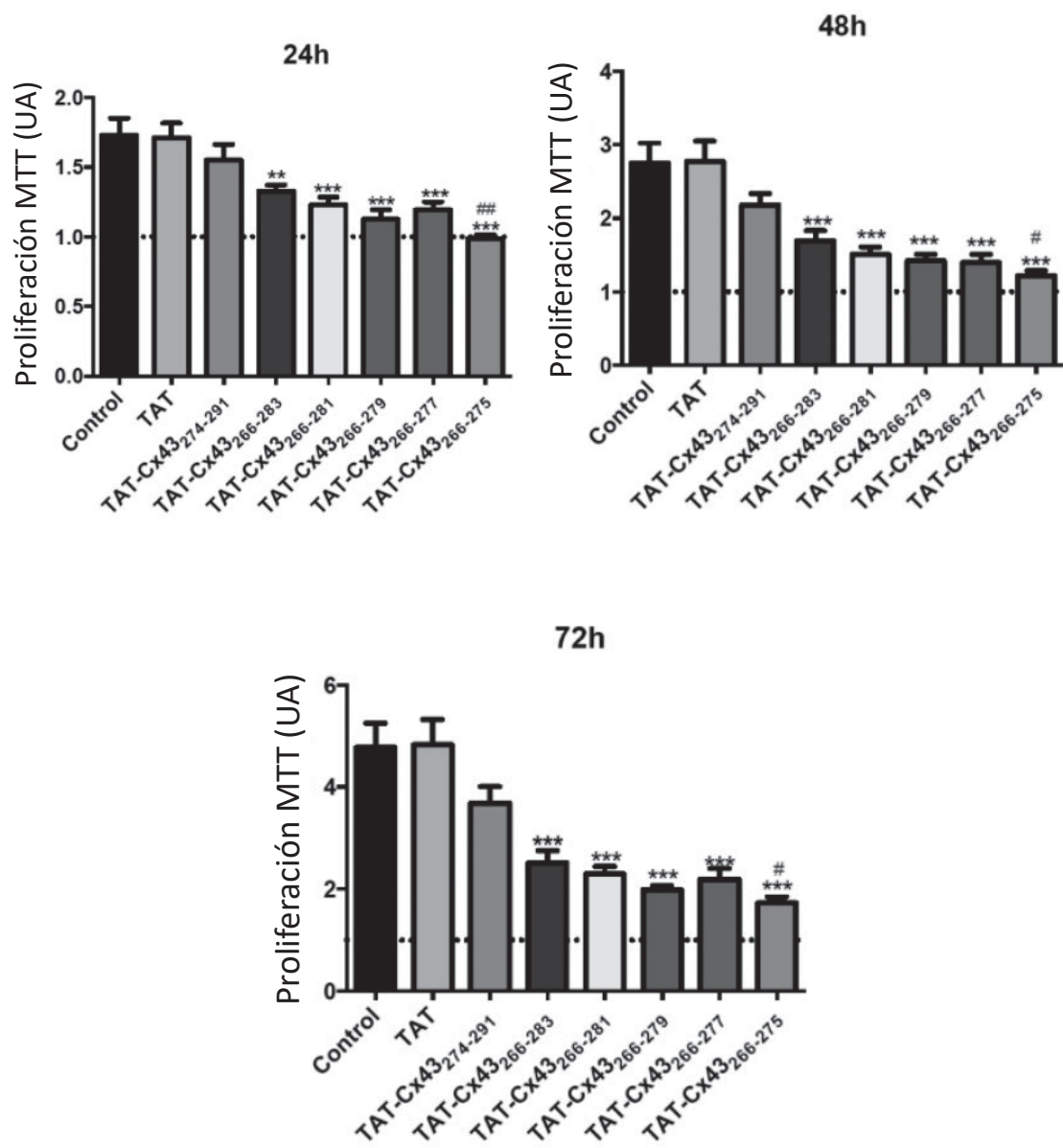
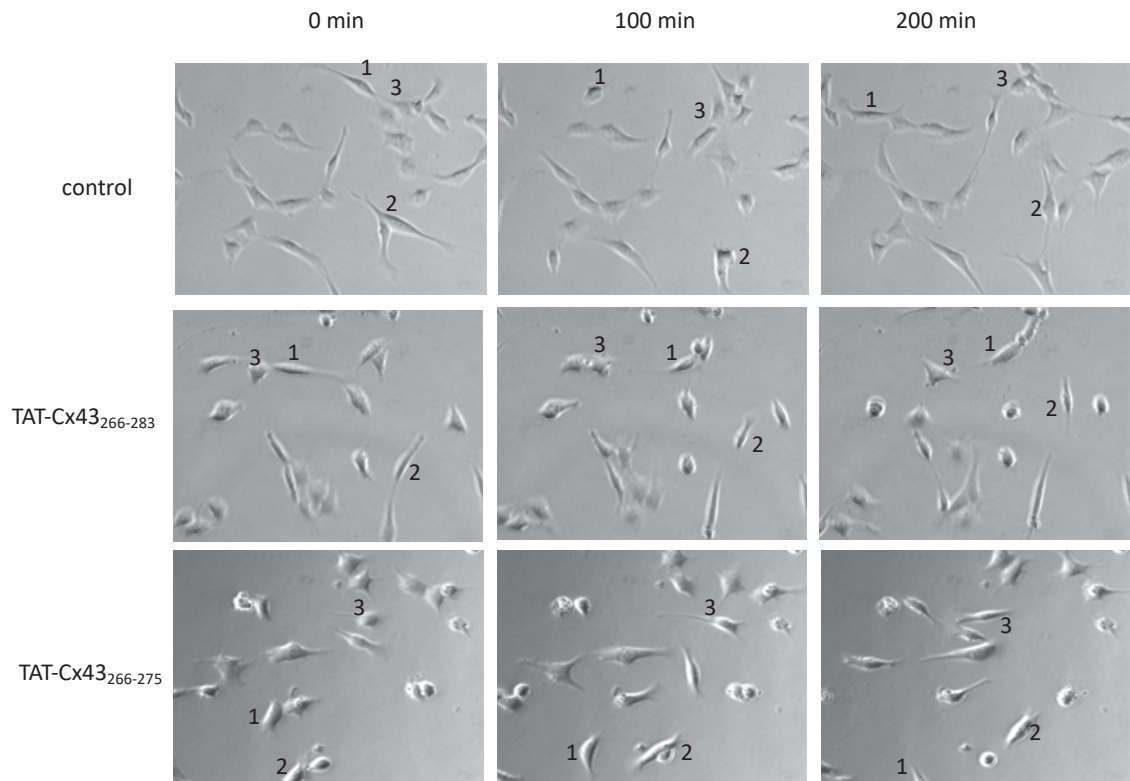


Fig. 6



**Fig. 7**



- ②① N.º solicitud: 202230039  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.01.2022  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Reivindicaciones afectadas                           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| X<br>A    | WO 2014191608 A1 (UNIV SALAMANCA) 04/12/2014, todo el documento                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 2-5, 17, 21-25, 27-33, 35-36<br>1, 6-16, 18-20,26,34 |
| X<br>A    | GARCÍA VICENTE L. Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en células de glioma, neuronas y astrocitos. Trabajo de fin de grado. Grado en Biología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, 24-10-2020 [en línea] [recuperado el 30/09/2022]. Recuperado de Internet <URL: <a href="https://gredos.usal.es/handle/10366/135823">https://gredos.usal.es/handle/10366/135823</a> >. páginas 3 - 5; páginas 8 - 26; | 2-5, 17, 21-25, 27-33, 35-36<br>1, 6-16, 18-20,26,34 |
| X<br>A    | GONZÁLEZ-SÁNCHEZ A. et al. Connexin43 recruits PTEN and Csk to inhibit c-Src activity in glioma cells and astrocytes. Oncotarget, 06/07/2016, Vol. 7, N° 31, todo el documento                                                                                                                                                                                                                                                      | 2-5, 17, 21-25, 27-33, 35-36<br>1, 6-16, 18-20,26,34 |
| X<br>A    | JARAÍZ-RODRÍGUEZ M. et al. A Short Region of Connexin43 Reduces Human Glioma Stem Cell Migration, Invasion, and Survival through Src, PTEN, and FAK. Stem Cell Reports, 08/08/2017, Vol. 9, Páginas 451-463, todo el documento                                                                                                                                                                                                      | 2-5, 17, 21-25, 27-33, 35-36<br>1, 6-16, 18-20,26,34 |
| X<br>A    | GANGOSO E. et al. A cell-penetrating peptide based on the interaction between c-Src and connexin43 reverses glioma stem cell phenotype. Cell Death and Disease, 23/01/2014, Vol. 5, N° e1023, <DOI: 10.1038/cddis.2013.560>, todo el documento                                                                                                                                                                                      | 2-5, 17, 21-25, 27-33, 35-36<br>1, 6-16, 18-20,26,34 |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.10.2022

Examinador  
M. Cumbreño Galindo

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K14/705** (2006.01)**A61K38/17** (2006.01)**A61P35/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI, REGISTRY