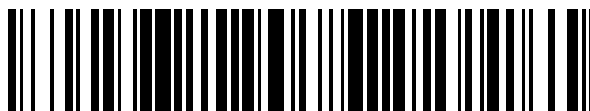


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 115**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08736144 .0**
96 Fecha de presentación: **11.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2144927**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Fármaco, medicamento, composición antitumorales y su uso**

30 Prioridad:
11.04.2007 EP 07290440
11.04.2007 US 783654

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2012

73 Titular/es:
GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA
Parc Scientifique EPFL, PSE-A
1015 Lausanne VD, CH

72 Inventor/es:
COLIN, Sylvie y
AL MAHMOOD, Salman

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 385 115 T3

DESCRIPCIÓN

Fármaco, medicamento, composición antitumorales y su uso

La presente invención se refiere al campo del tratamiento de cánceres. De modo más específico, la presente invención se refiere al tratamiento de cánceres mediante polipéptidos derivados de una proteína que pertenece a la superfamilia de las tetraspaninas.

El cáncer es un tipo de enfermedades o trastornos caracterizados por la división incontrolada de células y por la capacidad de estas células para propagarse, por crecimiento directo hacia tejidos adyacentes mediante su invasión, o mediante implantación en sitios distantes por metástasis (en la que las células del cáncer son transportadas a través de la corriente sanguínea o el sistema linfático). El cáncer puede afectar a personas de todas las edades, pero el riesgo tiende a aumentar con la edad. Es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados.

Existen muchos tipos de cánceres. La gravedad de los síntomas depende del sitio y del carácter de la malignidad y de si existe metástasis. Tras haber sido diagnosticado, el cáncer se trata habitualmente con una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia. A medida que se desarrollan las investigaciones, los tratamientos se están haciendo cada vez más específicos para el tipo de patología del cáncer. Ya existen fármacos que se dirigen a cánceres específicos para varios tipos de cánceres. Si no se tratan, los cánceres pueden finalmente provocar enfermedad y muerte, aunque este no siempre es el caso.

Los tratamientos actuales se dirigen a propiedades diferenciadas de las células malignas, tales como por ejemplo su capacidad para evitar la apoptosis, su potencial de crecimiento ilimitado (inmortalización) debido a la sobreabundancia de telomerasa, la autosuficiencia de los factores del crecimiento, la insensibilidad a anti-factores del crecimiento, una mayor velocidad de división celular, una capacidad alterada para diferenciarse, su incapacidad para el inhibición por contacto, la capacidad para invadir tejidos vecinos, la capacidad para construir metástasis en sitios distantes, la capacidad para estimular el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis).

La angiogénesis tumoral es la proliferación de una red de vasos sanguíneos que penetran en el tumor, suministrando nutrientes y eliminando productos de desecho. La angiogénesis tumoral se inicia realmente con la liberación de moléculas por las células tumorales cancerosas que envían señales al tejido normal circundante del hospedante. Esta señalización activa ciertos genes en el tejido del hospedante que, a su vez, fabrican proteínas para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Los tumores sólidos deben estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos para obtener los nutrientes y el oxígeno necesarios para su crecimiento, proporcionando con ello una vía a través de la cual los tumores pueden metastatizarse hacia sitios distantes.

Pruebas experimentales han sugerido que los tumores malignos pueden inducir la angiogénesis a través de la elaboración de una diversidad de factores, tales como el factor del crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), el factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor del crecimiento transformante-alfa (TGF-alfa), el factor del crecimiento de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) y muchos otros (Liotta *et al.*, 1991, Cell, 64:327-336; Hanahan *et al.*, Cell, 86:353-364).

En la actualidad, en el mercado están disponibles muchas moléculas quimioterapéuticas que se dirigen a la angiogénesis. Unos inhibidores de la angiogénesis naturales bien conocidos son la angiostatina, endostatina, interferones, factor de plaquetas 4, fragmento de 16 kd de prolactina, trombospondina, TIMP-1 (inhibidor de metaloproteasa de tejidos-1), TIMP-2, y TIMP-3. Estas moléculas pueden utilizarse como tratamiento quimioterapéutico, así como otros fármacos tales como, por ejemplo, combrestatina A4, EMD 121974, TNP-470, escualamina, talidomida, interferón-alfa, anti-VEGF, anticuerpos. Sin embargo, su eficacia no es suficiente y resultan deseables tratamientos alternativos.

Por tanto, son necesarios agentes quimioterapéuticos alternativos para el tratamiento de tumores que tengan mayor eficacia, que sean menos invasivos o tóxicos, y que produzcan una mayor tasa de recuperación.

El documento WO 03/074073, a nombre del solicitante, describe una familia de 54 genes implicados en la regulación de la angiogénesis. Entre estos genes, se indica que el "gen 497" (SEQ ID NO:1 en esta descripción), que codifica la "proteína 497" (SEQ ID NO:2 en esta descripción), también denominado TM4SF2 en el documento WO 03/074073, está implicado en la activación de la angiogénesis (proangiogénico). La expresión del gen 497 se potencia cuando la angiogénesis se ve estimulada por factores proangiogénicos, tales como VEGF y FGF2. El documento WO 03/074073 también indica que la expresión de un antisentido del gen 497, es decir, la inhibición de la expresión del gen 497, en células endoteliales humanas inhibe la formación de tubos capilares.

Análisis bioinformáticos han revelado que la proteína 497C, que comprende 244 aminoácidos, contiene un bucle extracelular SEL ("Small Extracellular Loop", bucle extracelular pequeño), un bucle extracelular LEL ("Large Extracellular Loop", bucle extracelular grande), cuatro tramos transmembrana y dos colas intracelulares que corresponden a los N- y C-terminales. Por tanto, esta proteína se ha clasificado como una miembro de la

superfamilia de las tetraspaninas (Levy *et al.*, Nat. Rev. Immunol., febrero de 2005, 5(2):136-148).

Las tetraspaninas son una gran familia de proteínas de la superficie celular conservadas a través de la evolución que se expresan en una amplia diversidad de organismos. Los miembros de esta familia tienden a asociarse entre sí, junto con sus compañeros, en microdominios de membrana que proporcionan un andamiaje para la transmisión de estímulos externos hacia componentes de señalización intracelulares. Básicamente, las tetraspaninas comprenden cuatro dominios transmembrana (TM) que contienen restos polares conservados y flanquean los bucles extracelulares pequeño y grande (SEL y LEL, respectivamente). El LEL está compuesto de un núcleo formado por hélices a, b y e, y esta estructura de núcleo está conservada en las tetraspaninas. Las hélices c y d comprenden la porción variable del LEL, y están flanqueadas por el motivo CCG y otros restos cisteína conservados. Esta región está plegada como resultado de los puentes disulfuro que forman una estructura con forma de champiñón.

Los miembros de esta superfamilia se han clasificado en tres grupos basados en el número de restos cisteína presentes en el dominio LEL. El grupo 1 contiene cuatro cisteínas en el dominio LEL, el grupo 2 contiene seis cisteínas en el dominio LEL, y el grupo 3 contiene ocho cisteínas en el dominio LEL.

Puesto que la proteína 497C contiene seis cisteínas en su dominio LEL, puede por tanto clasificarse en el grupo 2, de forma similar a la proteína CD151, otro miembro de esta familia. El dominio LEL de estas proteínas comprende 6 dominios: a, b, c, d1, d2 y e, entre los cuales d1, d2 y c consisten en las porciones variables del LEL.

Profundizando en sus investigaciones, los inventores produjeron formas truncadas de la proteína 497C, que corresponden a los diversos fragmentos del dominio extracelular SEL y LEL de la proteína 497C:

- 497C-T2: el dominio LEL completo de la proteína 497C, identificado por SEQ ID NO:3 en esta descripción (112 aminoácidos),

- 497C-T3: los dominios c, d1, d2 y e del dominio LEL, identificado por SEQ ID NO:4 en esta descripción (74 aminoácidos),

- 497C-T4: los dominios d1, d2 y e del dominio LEL, identificado por SEQ ID NO:5 en esta descripción (49 aminoácidos),

- 497C-T5: los dominios d2 y e del dominio LEL, identificado por SEQ ID NO:6 en esta descripción (43 aminoácidos).

Para asegurar la configuración tridimensional de estos fragmentos, es decir, la conformación tridimensional del dominio LEL, y por tanto su actividad potencial, los inventores añadieron, según una realización, una cola en el C-terminal de los fragmentos. Esta cola está compuesta por una secuencia aleatoria de 30 a 70 aminoácidos, preferiblemente de 45 a 65 aminoácidos, más preferiblemente de 50 a 60 aminoácidos, aún más preferiblemente de aproximadamente 55 aminoácidos. Esta cola no tiene actividad *per se*, y su supuesto papel es estabilizar la estructura tridimensional del fragmento LEL, es decir, mantener el polipéptido plegado en una forma biológicamente activa.

En un primer experimento, los inventores descubrieron que la proteína 497C-T2 puede inhibir la proliferación de células endoteliales humanas *in vitro* de una manera dependiente de la dosis.

Después, en un segundo experimento, los inventores descubrieron, de forma sorprendente, que las formas truncadas de la proteína 497C pueden tener una fuerte actividad para inhibir la formación de tubos capilares *in vitro*, de una manera dependiente de la dosis.

Otros experimentos realizados por los inventores sugieren que las formas truncadas de la proteína 497C inducen la inhibición de la migración de células endoteliales *in vitro*, de una manera dependiente de la dosis. Los resultados del estudio de respuesta a la dosis sobre la inhibición de la angiogénesis por 497C-T2 revelaron que a 270 nM, la proteína recombinante 497C-T2 induce una pequeña inhibición, mientras que a 540 nM, la 497C-T2 puede inhibir en más del 50% la angiogénesis *in vitro* (es decir $CI_{50} < 540$ nM). Esto demuestra que la proteína recombinante 497C-T2 es un potente compuesto antiangiogénico, y que puede ser al menos 200 veces más potente que el mAb anti-VEGF y/o los péptidos identificados basados en el receptor de VEGF (KDR) (Binetruy-Tournaire, R., *et al.*, Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis, EMBO J., 2000, 19:1525-1533).

La formación de tubos capilares, la proliferación de células endoteliales humanas y la migración de células endoteliales humanas son tres etapas fundamentales de la angiogénesis. Por consiguiente, el hecho de que 497C-T2 pueda inhibir la formación de tubos capilares *in vitro*, la proliferación de células endoteliales humanas y/o la migración de una manera dependiente de la dosis constituye por tanto una prueba sólida de la potente actividad antiangiogénica de las formas truncadas de la proteína 497C.

Todos estos resultados son absolutamente inesperados puesto que se ha descrito que la proteína 497C nativa es proangiogénica, y que la expresión de un antisentido del gen 497, es decir, la inhibición del gen 497, en células endoteliales humanas inhibe la formación de tubos capilares. Por tanto, resultó realmente sorprendente que las

formas truncadas de la proteína 497C puedan tener actividad antiangiogénica.

Además, los inventores ensayaron el efecto de 497C-T2 sobre la proliferación de muchas líneas celulares, incluyendo la línea celular de fibroblastos MRC5, CHO, las líneas celulares tumorales Calu-6, NCI-H460 y más, sin que apareciese ningún efecto antiproliferativo detectable incluso a concentración alta. En contraste, 497C-T2 inhibe significativamente la proliferación de células endoteliales humanas en una concentración tan baja como 500 nM, alcanzando 75% de inhibición a 5 μ M. Por tanto, además de ser más potente que las estrategias terapéuticas anti-VEGF disponibles en la actualidad, la 497C-T2 es muy específica para las células endoteliales.

De manera interesante, los inventores han descubierto que la forma truncada 497C-T3, que carece de los dominios a y b, es casi tan potente como 497C-T2 en la inhibición de la angiogénesis y la migración de células, lo cual indica que los dominios a y b sólo contribuyen ligeramente a la actividad biológica y/o a la conformación tridimensional necesaria para la actividad biológica de 497C-T2. Las formas truncadas 497C-T4 (que carecen de los dominios a, b y c) y 497C-T2 (que carecen de los dominios a, b, c y d1) tienen actividades limitadas con relación a la de 497C-T2, lo cual indica que ambos dominios c y d1 son necesarios para la actividad de la proteína 497C-T2.

Estos resultados también fueron inesperados, y condujeron a los inventores a ensayar la actividad antitumoral de 497C-T2 en ratones *in vivo*.

También de forma sorprendente, los inventores descubrieron que la proteína 497C-T2 tenía una potente actividad antitumoral *in vivo*, y una potente actividad sinérgica en combinación con otro agente quimioterapéutico tal como, por ejemplo, cisplatino.

Los inventores han descubierto que la sustancia de ensayo 497C-T2 no es tóxica en ratones *Nude* que portan tumores humanos NCI H460 o CALU-6 en diferentes dosis ensayadas. Además, la 497C-T2 muestra una potente actividad antitumoral estadísticamente significativa frente a los tumores NCI H460 y CALU-6 en un momento tan temprano como dos días después del comienzo del tratamiento (2ª inyección intraperitoneal combinada con CDDP). Esta actividad antitumoral persistió durante el periodo de tratamiento. El efecto antitumoral de 497C-T2 en este modelo de cáncer de pulmón humano representa una estrategia terapéutica realista como monoterapia. Su eficacia fue fuertemente potenciada cuando se combina con el fármaco anticáncer citotóxico CDDP (cisplatino), que reprime el crecimiento tumoral. Por otra parte, el cisplatino por sí solo no erradica el crecimiento tumoral.

No está claro si la actividad antiangiogénica de 497C-T2 es únicamente responsable de su actividad antitumoral. En la actualidad se acepta que compuestos biológicos, tales como antagonistas del receptor de Her-2, EGF e interferón pueden modular las respuestas del hospedante y potenciar la eficacia de quimioterapias convencionales. Los datos sugieren firmemente que 497C-T2 puede utilizarse como agente antitumoral principal o como una terapia sinérgica añadida a agentes citotóxicos principales para el tratamiento de cánceres.

Tal como se mencionó anteriormente, ahora se ha establecido que la proteína 497C se expresa en células endoteliales, y que su expresión se ve potenciada cuando la angiogénesis es estimulada por factores proangiogénicos, tales como VEGF y FGF2 (véase el documento WO 2003/074073). La proteína 497C pertenece a la superfamilia de las tetraspaninas, que son receptores transmembrana que comprenden dos bucles extracelulares, implicados en el reconocimiento de señales extracelulares, y dos colas intracelulares (C-terminal y N-terminal), implicadas en la transducción de la señal. Una característica clave en la transducción de señales es la formación de un complejo de ligando-receptor entre el bucle extracelular del receptor y el ligando. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores piensan que las formas truncadas de 497C pueden desempeñar su papel a través de un "mecanismo de receptor soluble": las formas truncadas de 497C pueden permanecer solubles sobre la superficie de la célula y pueden ser reconocidas por el ligando. Como resultado, puede haber una competición en el reconocimiento del ligado entre las formas solubles de 497C (los fragmentos de la invención) y la proteína transmembrana nativa, y por consiguiente una disminución, de una manera dependiente de la dosis, de la transducción de la señal proangiogénica, dando como resultado por tanto la inhibición de la angiogénesis y posteriormente una disminución del volumen tumoral.

La presente invención por tanto se refiere, en un primer aspecto, a un polipéptido activo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, que también comprende medios para plegarla en una conformación tridimensional activa. Preferiblemente, dichos medios para que se pliegue en una conformación activa consisten en cualquier secuencia que comprende de 30 a 70 aminoácidos, preferiblemente de 45 a 65 aminoácidos, más preferiblemente de 50 a 60 aminoácidos, aún más preferiblemente de aproximadamente 55 aminoácidos, estando dicha secuencia condensada con el C-terminal de dicho polipéptido. La secuencia que está condensada con el C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 es SEQ ID NO:18 (DRASP QPWRYRIRIL APSTSLRPHS STTTTTTXIR LLTKPERKLS WLLPPLSNN).

Tal como se emplea en la presente, "péptido" significa moléculas cortas formadas por el enlace, en un orden definido, de menos de 100 aminoácidos.

Tal como se emplea en la presente, "polipéptido" significa moléculas formadas por el enlace, en un orden definido, de al menos 100 aminoácidos.

Tal como se emplea en la presente, "polipéptido activo" significa polipéptidos que tienen una actividad biológica. En la

presente invención, los polipéptidos tienen una actividad antiangiogénica y antitumoral.

Tal como se emplea en la presente, "conformación tridimensional" significa la estructura terciaria de un polipéptido, es decir, su forma global, en la que el polipéptido realiza una función biológica.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un medicamento que comprende un polipéptido, según se describió anteriormente.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según se describió anteriormente, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según se describió anteriormente, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en un método de tratamiento del cáncer y/o de tumores del cuerpo humano o animal.

15 En una realización concreta, las composiciones farmacéuticas según se describió anteriormente comprenden además al menos otra sustancia activa seleccionada de sustancias antiangiogénicas o sustancias antitumorales. Los expertos en la técnica pueden elegir estas sustancias con respecto al efecto que se quiere lograr. Preferiblemente, estas sustancias pueden seleccionarse de cisplatino, carboplatino, etopósido, ifosfamida, mitomicina, vinblastina, vinorelbina, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, e irinotecano.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cantidades sinérgicas eficaces de:

- un polipéptido según se describió anteriormente, y

- un complejo de platino seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino.

20 El medicamento o la composición útil en la práctica de esta invención se administra al mamífero mediante vías convencionales. El medicamento o la composición descrita en la presente puede administrarse por la misma vía, o por vías diferentes. Por ejemplo, el medicamento o la composición puede administrarse a pacientes por vía oral o parenteral (por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal y similares).

25 Cuando se administra por vía parenteral, la composición se formula preferiblemente en una forma de dosificación unitaria inyectable (disolución, suspensión, emulsión) con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos excipientes generalmente son no tóxicos y no terapéuticos. Los ejemplos de dichos excipientes son agua, vehículos acuosos, tales como disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, y disolución de Hank, y vehículos no acuosos, tales como aceites no volátiles (por ejemplo, aceite de maíz, de algodón, de cacahuete y de sésamo), oleato de etilo, y miristato de isopropilo. La disolución salina estéril es un excipiente preferido. El excipiente puede contener
30 cantidades pequeñas de aditivos, tales como sustancias que potencian la solubilidad, la isotonicidad y la estabilidad química, por ejemplo, antioxidantes, tampones y conservantes. Cuando se administran por vía oral (o rectal), los compuestos habitualmente se formulan en una forma de dosificación unitaria tal como un comprimido, una cápsula, un supositorio o un sello. Estas formulaciones generalmente incluyen un diluyente o vehículo sólido, semisólido o líquido. Los ejemplos de diluyentes y de excipientes son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga,
35 fosfato de calcio, aceite mineral, mantequilla de cacao, aceite de teobroma, alginatos, tragacanto, gelatina, metilcelulosa, polioxietileno, monolaurato de sorbitán, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco y estearato de magnesio. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica según la invención se administra por vía intravenosa.

40 Según la invención, la cantidad de polipéptido presente en el medicamento o la composición es eficaz para tratar tumores susceptibles. Preferiblemente, el polipéptido está presente en una cantidad del 0,01% al 90% en peso, preferiblemente del 0,1% al 10% en peso, más preferiblemente del 1% al 5% en peso, en el medicamento o en la composición. Los expertos en la técnica adaptan de modo rutinario estas cantidades, porque son capaces de elegir la mejor cantidad para administrar a un paciente para lograr la recuperación.

45 En un sexto aspecto, la invención se refiere al uso del polipéptido según se describió anteriormente, o del medicamento según se describió anteriormente, o de la composición farmacéutica según se describió anteriormente, para el tratamiento de cánceres y/o tumores.

50 Según la invención, los tumores que se van a tratar son preferiblemente tumores sólidos. Más preferiblemente, los tumores que se van a tratar se seleccionan de sarcomas, carcinomas y linfomas. Los ejemplos de estos tumores son cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de mama, linfoma no hodgkiniano, cáncer de cerebro, cáncer de hueso, cáncer de colon y rectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de tiroides, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico).

En un séptimo aspecto, la presente descripción se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar aun sujeto que necesite tratamiento el polipéptido según se describió anteriormente, o el medicamento según se describió

anteriormente, o la composición farmacéutica según se describió anteriormente, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento del cáncer o tumor.

En un aspecto particular, la descripción se refiere al método de tratamiento según se describió anteriormente que comprende además administrar al menos otro fármaco antineoplásico o antitumoral.

- 5 En estos métodos, la administración comprende la administración tópica, la administración oral, la administración intravenosa, o la administración intraperitoneal.

En un octavo aspecto, la presente descripción se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad sinérgica eficaz de:

- un polipéptido según se describió anteriormente, y

- 10 - un complejo de platino seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino, que es suficiente para inhibir el crecimiento del cáncer o tumor.

En un aspecto, dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran de modo simultáneo.

- 15 En otra realización, dicho polipéptido o sus fragmentos, y dicho complejo de platino se administran de modo secuencial. Preferiblemente, dicho polipéptido o sus fragmentos, y dicho complejo de platino se administran por vías separadas, es decir, por vía oral o parenteral (por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal y similares).

En una realización particular, dicho complejo de platino es cisplatino.

En otro aspecto particular, dicho complejo de platino es carboplatino.

La presente invención se describirá más a fondo a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

- 20 La figura 1 es un diagrama que representa el porcentaje de inhibición de la proliferación de células endoteliales *in vitro* con concentraciones crecientes de la proteína 497C-T2.

Las figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2f, 2g, 2h y 2i son fotografías de la angiogénesis *in vitro* de células endoteliales en diferentes condiciones:

- Figura 2a: Control (tampón urea 2 M)

- 25 - Figura 2b: 497C-T2 6,5 µg/ml (0,27 µM)

- Figura 2c: 497C-T2 13 µg/ml (0,54 µM)

- Figura 2d: 497C-T2 26 µg/ml (1,08 µM)

- Figura 2e: 497C-T2 48 µg/ml (2 µM)

- Figura 2f: 497C-T3 51 µg/ml (2,55 µM)

- 30 - Figura 2g: 497C-T4 55 µg/ml (3,18 µM)

- Figura 2h: 497C-T5 56 µg/ml (3,35 µM)

- Figura 2i: cola C-terminal 53 µg/ml (4,14 µM)

Las figuras 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f y 3g son fotografías del ensayo de la herida en células endoteliales realizado en diferentes condiciones:

- 35 - Figura 3b: 497C-T2 20 µg/ml (0,83 µM)

- Figura 3c: 497C-T2 40 µg/ml (1,66 µM)

- Figura 3d: 497C-T3 48 µg/ml (2,4 µM)

- Figura 3e: 497C-T4 60 µg/ml (3,52 µM)

- Figura 3f: 497C-T5 61 µg/ml (3,65 µM)

- 40 - Figura 3g: cola C-terminal 63 µg/ml (4,92 µM)

La figura 4 es una gráfica que representa la media del volumen tumoral (mm^3) frente al tiempo (días) para diferentes grupos de ratones tratados según el ejemplo 7.

La figura 5 es una gráfica que representa la media relativa del volumen tumoral (sin unidades) frente al tiempo (días) para diferentes grupos de ratones tratados según el ejemplo 7.

- 5 La figura 6 es una gráfica que representa la media del volumen tumoral (mm^3) frente al tiempo (días) para diferentes grupos de ratones tratados según el ejemplo 8.

La figura 7 es una gráfica que representa la media relativa del volumen tumoral (sin unidades) frente al tiempo (días) para diferentes grupos de ratones tratados según el ejemplo 8.

Ejemplo 1: Producción de la proteína 497C-T2

10 *Síntesis del inserto 497C-T2:*

En primer lugar, el gen 497C se clonó en el sistema de vector pGEM®-T Easy (Promega®) según procedimientos conocidos (el vector obtenido se denominó "pGEM-T-497C").

- 15 En segundo lugar, el inserto T2 (SEQ ID NO:3) que corresponde a la parte extracelular LEL de la proteína 497C se amplificó mediante PCR utilizando el plásmido "pGEM-T-497C" y los dos cebadores CDS5 (SEQ ID NO:9) y CDS4 (SEQ ID NO:10) (tabla 1), que enmarcan el dominio LEL en 5' y 3', respectivamente.

Tabla 1

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
497c-cds-5	9	<u>GACGACGACAAGAT</u> ttcaggggtttgtgtttcgtcatgagatcaa
497c-cds-4	10	GAGGAGAAGCCCGGTtccagcgatgattcccatgtt

- 20 En tercer lugar, la secuencia de ADN que codifica la proteína 497C-T2 se inserta en el vector pET-30 EK/LIC (Novagen®) según procedimientos conocidos (pET-30-497C-T2). La secuencia de ácido nucleico que codifica 497C-T2 dentro del vector pET-30 se indica en SEQ ID NO:7.

El vector purificado entonces se introdujo en *E. coli* BL21(DE3) pLys para la producción de proteínas. Las colonias se controlaron para la presencia del vector y del inserto mediante PCR.

- 25 El tamaño de la proteína producida 497C-T2 era de 24 kD, y fue mayor que el tamaño esperado. Esto es debido a la adición de una cola suplementaria en el C-terminal (54 aminoácidos aleatorios), así como de un marcador de His en el N-terminal, según se confirmó mediante secuenciación. La secuencia de aminoácidos de la proteína 497C-T2 producida se indica en SEQ ID NO:8. La proteína 497C-T2 se produjo dentro de la fracción insoluble de las bacterias, que necesitó de una extracción en condiciones desnaturalizantes.

Extracción y purificación de la proteína 497C-T2

- 30 Tras el cultivo, las bacterias se lisaron, se centrifugaron y se rechazó el sobrenadante. La fracción insoluble obtenida se trató con Tris-HCl 20 mM, urea 8 M, imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, GSH 5 mM, pH 8,0. Después de este tratamiento, la suspensión se centrifugó, se recogió el sobrenadante, y se filtró en membranas de 0,45 μm para rechazar los materiales insolubles. El extracto filtrado entonces se utilizó para purificar la proteína 497C-T2 utilizando una columna His-Trap (Amersham®) conectada a un sistema de HPLC (Amersham).

- 35 La proteína purificada obtenida se diluyó en urea 4 M e imidazol 0,3 M. Para retirar estos agentes de la preparación, la disolución se sometió a una diálisis a 4 °C.

- 40 Tras estas etapas de diálisis, la proteína purificada se centrifugó a 4.000 x g durante 15 min y se filtró con una membrana de 0,45 μm para eliminar posibles precipitados. La preparación de proteínas purificadas se controló para el contenido en proteínas según el método descrito por Bradford en 1976 (Anal. Biochem., 72:248-254) y mediante SDS-PAGE. Los geles se analizaron utilizando el programa informático Gene Genius para cuantificar la pureza mediante un análisis de imágenes.

- 45 Para aumentar la pureza de la proteína 497C-T2, los inventores realizaron una segunda etapa de purificación utilizando una cromatografía líquida de intercambio iónico. La preparación purificada con His-Trap se diluyó 3 veces con el tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8, urea 2 M (para disminuir la concentración de NaCl hasta 50 mM), y se cargó en una columna MonoS conectada a un sistema de HPLC dirigido por el programa informático Unicorn (Amersham, GE, Saclay, Francia). La columna entonces se lavó a fondo y se eluyó con un gradiente lineal de fuerza iónica (NaCl 0,05 M a 0,5 M en el

tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8, urea 2 M). La preparación de proteína purificada se controló para el contenido en proteínas mediante Bradford y mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 2: Diseño y producción de las formas truncadas 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5

- 5 Para identificar el sitio activo de la proteína 497C-T2, se diseñaron y se produjeron otras tres formas truncadas, denominadas 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5, además de un polipéptido control que corresponde al marcador de His unido al N-terminal y a la cola C-terminal que proviene del vector. Para esto se diseñaron cebadores específicos 5' que permiten el progresivo truncamiento de la secuencia N-terminal de la proteína 497C-T2 sin afectar al marcador de His N-terminal necesario para la purificación de las formas truncadas producidas.

497C-T3

- 10 La 497C-T3 truncada se construyó mediante la amplificación por PCR del ADN utilizando el vector pET30-497C-T2 como molde, el cebador específico 5' 497c-cds7 (SEQ ID NO:11), que permite eliminar la mayor parte del dominio b y conservar el primer puente C-C, y el cebador específico 3' 497c-cds4 (SEQ ID NO:10).

Tabla 2

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
497c-cds7	11	5' GACGACGACAAGATGCAGCGCAGCCTGAGCTGC 3'
497c-cds-4	10	3' <u>GAGGAGAAGCCCGGT</u> tctccagcgatgattcccatgtt 5'

15 497C-T4

La 497C-T4 truncada se construyó mediante la amplificación por PCR del ADN utilizando el vector pET30-497C-T2 como molde, el cebador específico 5' 497c-cds9 (SEQ ID NO:12), que permite eliminar el primer puente C-C, los dominios b y c, y conservar el dominio d1, y el cebador específico 3' 497c-cds4 (SEQ ID NO:10).

Tabla 3

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
497c-cds9	12	5' GACGACGACAAGATCCCCCCCAGCTGCTGCATG 3'
497c-cds-4	10	3' <u>GAGGAGAAGCCCGGT</u> tctccagcgatgattcccatgtt 5'

20

497C-T5

- 25 La 497C-T5 truncada se construyó mediante la amplificación por PCR del ADN utilizando el vector pET30-497C-T2 como molde, el cebador específico 5' 497c-cds11 (SEQ ID NO:13), que permite eliminar el primer y el segundo puente C-C, los dominios b, c y d1, y conservar la secuencia lineal que corresponde a los dominios d2 y e, y el cebador específico 3' 497c-cds4 (SEQ ID NO:10).

Tabla 4

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
497c-cds11	13	5' GACGACGACAAGATGAACGAACTGATTGTAATCCCC 3'
497c-cds-4	10	3' <u>GAGGAGAAGCCCGGT</u> tctccagcgatgattcccatgtt 5'

Para el marcador de His N-terminal y la cola C-terminal, las construcciones se obtuvieron utilizando los siguientes cebadores que eliminan totalmente la secuencia de la proteína 497C-T2.

30

Tabla 5

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
---------	------------	-----------

Pet30 cds1	14	5 ' GACGACGACAAGATGGACCGGGCTTCTCCT 3 '
pet30 cds2	15	5 ' GAGGAGAAGCCCGGTCTAGTTATTGCTCAGCGG 3 '

Los productos amplificados que corresponden a las formas truncadas 497C-T3, 497C-T4, 497C-T5, y la cola C-terminal se clonaron y se produjeron según se describe para la proteína 497C-T2.

Ejemplo 3: Ensayo de inhibición de la proliferación de células endoteliales por 497C-T2 *in vitro*

5 Cultivo celular

Se cultivaron células HUVEC hasta la confluencia en medio EGM2-MV completo (Cambrex) a 37 °C y en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Las células entonces se recogieron mediante una digestión con tripsina-EDTA (Versene, Eurobio). Después de 5 min, la reacción enzimática se detuvo añadiendo 3 ml del medio de cultivo que contenía FCS al 5%. Las células entonces se centrifugaron a 220 g durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con 5 ml de medio de cultivo, se suspendieron en medio de cultivo completo, se contaron y se ajustaron a 50.000 células/ml. Entonces se distribuyeron 100 µl por pocillo en una microplaca de calidad de cultivo celular de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) y se incubaron con diferentes concentraciones de la proteína purificada 497C-T2 en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8), que contenía NaCl 150 mM y urea 2 M; este tampón se empleó como control.

Después de 42 horas a 37 °C se midió la proliferación celular utilizando el método de bromuro de tetrazolio (azul de tiazolilo) (MTT). Brevemente, el MTT (Sigma) se disolvió en PBS a 5 mg/ml, la disolución se filtró (0,22 µm) y se añadieron 10 µl a cada pocillo de las microplacas de 96 pocillos. Después de 3 horas de incubación a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, las microplacas se centrifugaron a 220 x g durante 10 min, se rechazó el sobrenadante y los cristales se disolvieron mediante la adición de 100 µl de DMSO a cada pocillo. Entonces se midió la densidad óptica (DO) a 570 nm utilizando el lector de microplacas µQuant (Bio-Tek Instrument gmbh, Colmar, Francia) acoplado al programa informático KC4 (Bio-Tek). La DO se corrigió restando los valores de DO de los pocillos de blanco (los valores de DO obtenidos de los pocillos sin células), y se midió la inhibición de la proliferación celular con relación al control (la DO obtenida de pocillos con HUVEC no tratadas representan la respuesta proliferativa máxima, es decir, 100%).

Tal como se muestra en la figura 1, la proteína 497C-T2 inhibe la proliferación de células endoteliales humanas de una manera dependiente de la dosis. Esta inhibición representa 77% a 122 µg (es decir, 5 µM) de proteína 497C-T2.

Ejemplo 4: Inhibición de la angiogénesis *in vitro* por 497C-T2, 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5

Las proteínas purificadas 497C-T2, 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5 se ensayaron *in vitro* sobre la angiogénesis de HUVEC inducida por FGF2 y VEGF en Matrigel.

Se prepararon placas de 24 pocillos con 250 µl de BD Matrigel™/pocillo y después se incubaron durante 30 minutos en un incubador. Entonces se prepararon células HUVEC como se describe en el ejemplo 3, y se sembraron 70.000 células por pocillo y se incubaron con diferentes concentraciones de la proteína purificada 497C-T2, 497C-T3, 497C-T4, o 497C-T5 en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8), que contenía NaCl 150 mM y urea 2 M; este tampón se utilizó como control:

- Figura 2a: Control (tampón urea 2 M)

- Figura 2b: 497C-T2 6,5 µg/ml (0,27 µM)

35 - Figura 2c: 497C-T2 13 µg/ml (0,54 µM)

- Figura 2d: 497C-T2 26 µg/ml (1,08 µM)

- Figura 2e: 497C-T2 48 µg/ml (2 µM)

- Figura 2f: 497C-T3 51 µg/ml (2,55 µM)

- Figura 2g: 497C-T4 55 µg/ml (3,18 µM)

40 - Figura 2h: 497C-T5 56 µg/ml (3,35 µM)

- Figura 2i: cola C-terminal 53 µg/ml (4,14 µM)

Tal como se muestra en las figuras 2b, 2c, 2d y 2e, la proteína 497C-T2 inhibe la angiogénesis *in vitro* de una manera dependiente de la dosis.

Además, tal como se muestra en las figuras 2f, 2g y 2h, las formas truncadas 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5 mostraron

diferentes niveles de actividad: 497C-T3 (figura 2f) y 497C-T4 (figura 2g) fueron casi tan eficaces como 497C-T2 para la actividad antiangiogénica, lo cual sugiere que los dominios a, b y c de LEL no son necesarios para la actividad antiangiogénica de la proteína 497C-T2. Por el contrario, 497C-T5 (figura 2h) sólo muestra una actividad inhibidora residual, mientras que la cola C-terminal es totalmente inactiva (figura 2i).

5 **Ejemplo 5: Inhibición de la migración de células endoteliales humanas por 497C-T2, 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5**

Se ensayó la migración de células mediante el ensayo de la herida descrito por Sato y Rifkin (J. Cell. Biol., 1988, 107:1199) con pocas modificaciones. Se sembraron HUVEC cultivadas en medio de crecimiento EGM-2MV (Cambrex) en placas de 24 pocillos a 80.000 células por pocillo en 500 µl de medio de crecimiento y se cultivaron hasta la confluencia a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Las células se rasparon con una punta de plástico pero sólo en una línea. Después de realizar la herida el medio de cultivo se cambió por medio fresco (control, figura 3a) o medio fresco suplementado con:

- Figura 3b: 497C-T2 20 µg/ml (0,83 µM)

- Figura 3c: 497C-T2 40 µg/ml (1,66 µM)

- Figura 3d: 497C-T3 48 µg/ml (2,4 µM)

15 - Figura 3e: 497C-T4 60 µg/ml (3,52 µM)

- Figura 3f: 497C-T5 61 µg/ml (3,65 µM)

- Figura 3g: cola C-terminal 63 µg/ml (4,92 µM)

Después de 18 horas de cultivo, las células se observaron y se fotografiaron bajo un microscopio inverso (Analysis, Olympus, Rungis, Francia).

20 Tal como se muestra en las figuras 3b y 3c, la proteína 497C-T2 inhibe la migración de las células endoteliales humanas de una manera dependiente de la dosis.

Además, tal como se muestra en las figuras 3d, 3d, 3e y 3f, las formas truncadas 497C-T3, 497C-T4, y 497C-T5 mostraron diferentes niveles de actividad. La forma truncada 497C-T3 inhibe la migración de las células de una manera similar a la proteína 497C-T2 (figura 3d). Por el contrario, la forma truncada 497C-T4 (figura 3e) es menos activa que 497C-T2, 497C-T5 (figura 3f) muestra una actividad antimigratoria muy limitada, y la cola C-terminal (figura 3g) es totalmente inactiva. Por tanto, estos resultados sugieren que los dominios a y b de LEL no son necesarios para la actividad antimigratoria de la proteína 497C-T2.

Ejemplo 2: Expresión de la proteína 497C en muestras de tumor

30 Se seleccionó una serie de diferentes muestras de tumores humanos para la expresión del gen 497C. Para cada muestra patológica se separó la periferia del tumor de la parte central del tumor, y se comparó la expresión del gen 497C en estas dos áreas después de la extracción de ARNm, seguido de una RT-PCR.

Muestras de tumor de riñón

Se analizaron 19 biopsias patológicas de tumores de riñón. En 13 de 19 pacientes, la expresión de 497C es mucho mayor en la parte central que en la periferia del tumor

35 *Muestras de tumor de pulmón*

Se analizaron 40 biopsias patológicas de tumores de pulmón humanos. En 37 de 40 pacientes, la expresión de 497C es mucho mayor en la periferia que en la parte central del tumor. También existe una relación cercana entre el nivel de expresión de 497C en la periferia del tumor y el estado de los nódulos del paciente (es decir, el potencial de metástasis). El examen anatómico de las muestras también reveló que la periferia del tumor estaba mucho más vascularizada que la parte central del tumor (según se establece para el cáncer de pulmón en general).

Muestras de tumor de colon

Se analizaron 33 biopsias patológicas de tumores de colon humanos. En 25 de 33 pacientes la expresión de 497C fue mucho mayor en la periferia que en la parte central del tumor.

Ejemplo 7: Ensayo de 497C-T2 sobre el tumor humano NCI H460 en ratones atímicos de raza Swiss *in vivo*

45 *Preparación de las células NCI H460*

Se cultivaron células NCI H460 como células adherentes en medio RPMI 1640 completo (referencia CM1RPM08-01, n° de lote 623615, Eurobio, Francia) que contenía L-glutamina 2 mM, ajustado a glucosa 4,5 g/l (referencia G7528, n° de

lote 033K0121, Sigma, Francia) y suplementado con HEPES 10 mM (referencia H0887, nº de lote 113K2338, Sigma, Francia), piruvato de sodio 1,0 mM (referencia CSTVAT00-0U, nº de lote 520818, Sigma, Francia) y suero de ternera fetal al 10% (FCS, referencia CVFSVF00-01, nº de lote S13021, Eurobio, Francia) a 37 °C, bajo una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Se amplificaron en matraces de 75 cm² hasta alcanzar 90 x 10⁶ células.

- 5 En D0, las células NCI H460 (carcinoma de pulmón humano) se recogieron de matraces de 75 cm² retirando el medio y añadiendo 3 ml de tripsina-EDTA (referencia CEZTDA00-0U, nº de lote 633920, Eurobio, Francia). Después de 5 min de incubación a 37 °C las células se desprendieron del plástico y se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de 3 ml de medio RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10%. Las células entonces se centrifugaron a 700 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 sin suero que contenía L-glutamina (2 mM), glucosa (4,5 g/l), piruvato de sodio (1 mM) y tamponado con HEPES (10 mM). Las células se contaron y el número de células NCI H460 viables fue > 99%. Entonces se ajustó el número de células a 25 x 10⁶ células/ml en medio sin suero.

Inducción de tumores

- 15 Se anestesiaron 30 ratones sanos *Nude* de raza Swiss hembra mediante una inyección intraperitoneal de quetamina-xilazina (80 mg/kg-12 mg/kg, referencia K-113, Sigma, Francia). Después las células NCI H460 (5 x 10⁶ células/ratón en 200 µl de medio sin suero) se implantaron de forma subcutánea en el flanco derecho de cada ratón.

Programa de tratamiento

- 20 En D12 tras la implantación de las células NCI H460, los treinta ratones se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos de 5 ratones. El volumen de los tumores había alcanzado 228 a 468 mm³, y la media del volumen de los tumores no fue estadísticamente diferente entre los grupos después de la aleatorización.

El programa de tratamiento, que comenzó en D12 y finalizó en D28, se resume en la tabla 6.

- Los animales del grupo 1 se trataron con la disolución del vehículo (lote C): Tris-HCl, pH 7,5, urea 2 M, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM.
- 25 - Los animales del grupo 2 se trataron con una disolución de cisplatino en suero fisiológico 0,5 ml/ml (CDDP, dicloruro de cis-diaminoplatino(II), referencia P4394, nº de lote 014K0993, Sigma, Francia, pureza del 100%, P.M. 300).
- Los animales de los grupos 3 y 4 se trataron con la disolución del vehículo suplementada con 1 mg/ml de la sustancia de ensayo 497C-T2 (lote A).
- Los animales del grupo 5 se ensayaron con la disolución del vehículo suplementada con 1 mg/ml de la sustancia de ensayo 497C-T2 (lote A), y también recibieron CDDP.
- 30 - Los animales del grupo 6 se trataron con la disolución del vehículo suplementada con 1,8 mg/ml de la sustancia de ensayo 497C-T2 (lote B), y también recibieron CDDP.

Todas las disoluciones se inyectaron por vía intraperitoneal. Las inyecciones en los grupos 1, 2, 3, 5, y 6 se realizaron según el programa Q2DX8, es decir, 1 cantidad cada dos días, ocho veces. Las inyecciones en el grupo 4 se realizaron según el programa Q1DX16, es decir, 1 cantidad cada día, dieciséis veces.

- 35 El CDDP se resuspendió en suero fisiológico estéril a una concentración de 0,5 mg/ml y se inyectó por vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/kg en un volumen de 10 ml/kg, según el programa de tratamiento Q2DX8.

Los ratones se observaron durante 2 h después de la inyección. Se empleó quetamina/xilazina (80 mg/kg-12 mg/kg, referencia K-113, Sigma, Francia) para anestesiarse a los animales antes de su sacrificio mediante dislocación cervical.

Control de los ratones

- 40 Los animales se observaron a diario. La modificación en el comportamiento de los animales se anotó en el cuaderno del laboratorio. Se registraron los pesos corporales y los volúmenes tumorales cada dos días hasta el final del experimento.

Se calcularon los datos indicados a continuación:

- Se trazaron curvas de crecimiento tumoral utilizando la media del volumen de los tumores (MTV).
- 45 - Se calculó la media relativa del volumen de los tumores (MRTV) como la proporción entre la MTV en el tiempo t y el volumen en el momento de la inyección (t = D12).
- Se evaluó la inhibición del crecimiento tumoral (T/C, %) como la proporción de la media del volumen de los tumores de los grupos tratados frente al grupo con vehículo.

Tabla 6

Grupo	nº de animales	Tratamiento	Vía de administración	Dosis de tratamiento (mg/kg/adm)	Volumen de administración	Programa de tratamiento
1	5	Vehículo (lote C)	intraperitoneal	0	10 ml/kg	Q2DX8
2	5	Cisplatino	intraperitoneal	5		Q2DX8
3	5	497C-T2 (lote A)	intraperitoneal	10		Q2DX8
4	5	497C-T2 (lote A)	intraperitoneal	10		Q1DX16
5	5	497C-T2 (lote A) y cisplatino	intraperitoneal	10 5		Q2DX8 Q2DX8
6	5	497C-T2 (lote B) y cisplatino	intraperitoneal	18		Q2DX8
				5		Q2DX8

Tabla 7: Peso corporal medio (MBW) de los ratones que portan tumores NCI H-460 tratados con el vehículo, CDDP a 5 mg/kg (programa Q2DX8, G2), 497C-T2 a 10,0 mg/kg (programa Q2DX8, G3), 497C-T2 a 10,0 mg/kg (programa Q1DX16, G4), combinación de 497C-T2 a 10,0 mg/kg y CDDP a 5 mg/kg (programa Q2DX8, G5), y combinación de 497C-T2 a 18,0 mg/kg y CDDP a 5 mg/kg (programa Q2DX8, G6) en D12 y D28.

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis de tratamiento (mg/kg)	MBW en D12 (g)	MBW en D28 (g)	MBWC D12-D18 (g)
1	Vehículo-lote C	0	22,53 ± 0,79	23,72 ± 0,72	1,18 ± 0,79
2	Cisplatino	5,00	21,29 ± 0,41	18,74 ± 1,59	-2,55 ± 1,83
3	497C-T2-lote A	10,0	24,06 ± 1,59	25,70 ± 1,12	1,63 ± 1,59
4	497C-T2-lote A	10,0	21,76 ± 1,63	23,68 ± 2,17	1,91 ± 1,36
5	497C-T2-lote A + cisplatino	10,0 5,00	23,28 ± 2,03	20,19 ± 0,66	-3,09 ± 2,68
6	497C-T2-lote B + cisplatino	18,00 5,00	23,08 ± 1,78	19,00 ± 2,00	-4,08 ± 0,71

Estudios estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos de los volúmenes tumorales (V), el tiempo hasta alcanzar "V", el tiempo de duplicación del tumor (DT), el volumen tumoral relativo (RTV), y la inhibición del crecimiento tumoral (T/C) para todos los grupos. Los datos se expresan como media $\pm$ DE. Los grupos de datos tenían una distribución normal. Se realizaron análisis univariantes para evaluar las diferencias entre los grupos. Entonces se determinó la significancia estadística utilizando el ensayo de la t de Student. Se consideró que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando XLSTAT (Addinsoft, Francia).

Control del peso corporal

Tal como se muestra en la tabla 7, el vehículo no tiene impacto sobre el peso corporal: el comportamiento y la ganancia de peso corporal de los ratones fueron normales y ningún animal murió de forma prematura. No se observó toxicidad durante el desarrollo del tratamiento con la sustancia de ensayo 497C-T2 a ambas dosis ensayadas (10 y 18 mg/kg). En contraste, se observó una importante toxicidad en los grupos 2, 5, y 6 tratados con CDDP (de -12% al -18% de pérdida de peso corporal; $p < 0,05$).

Los resultados de los parámetros de la media del volumen tumoral (MTV), la media relativa del volumen tumoral (MRTV), el volumen tumoral y el crecimiento tumoral se muestran en las figuras 4, 5 y en la tabla 8 y 9.

Tal como se muestra en la tabla 8, la MTV disminuyó en D28 en los ratones del grupo 2 tratados con CDDP ($1440 \pm 1097 \text{ mm}^3$) comparado con ratones del grupo 1 con vehículo ($4441 \pm 1135 \text{ mm}^3$). La MTV en D28 también disminuyó en los grupos 3 y 4 tratados con la sustancia de ensayo 497C-T2 a 10 mg/kg con una inyección diaria ($2482 \pm 2075 \text{ mm}^3$) y una inyección cada día alterno ($3167 \pm 1681 \text{ mm}^3$), respectivamente. Se observó una enorme reducción en la MTV en los animales del grupo 5 ($807 \pm 692 \text{ mm}^3$) y grupo 6 ($639 \pm 416 \text{ mm}^3$) comparado con el grupo 1, los animales tratados con el vehículo ($4441 \pm 1135 \text{ mm}^3$).

La proporción T/C, que es un parámetro de la inhibición del crecimiento tumoral, representa 32% en los ratones del grupo 2 en D28, lo cual demuestra que CDDP reduce en 68% el tamaño tumoral comparado con el grupo 1 tratado con vehículo. La T/C fue del 56% en ratones del grupo 3, y del 71% en ratones del grupo 4, lo cual revela una actividad antitumoral moderada de la sustancia de ensayo cuando se utiliza como monoterapia. Sin embargo, cuando se combina con CDDP, T/C disminuye hasta 18% y 14% en los ratones de los grupos 5 y 6, respectivamente. Esto demuestra que 497C-T2 tiene una potente actividad antitumoral cuando se combina con un agente citotóxico, tal como CDDP.

El tiempo de duplicación del tamaño tumoral (DT) fue de $1,23 \pm 0,49$ días en el grupo 1 tratado con vehículo. El DT aumentó en 4 veces en los ratones del grupo 2 tratados sólo con CDDP ($5,12 \pm 2,89$ días). Para los grupos 3 y 4, el DT ($4,08 \pm 1,4$, y $5,9 \pm 1,21$ días, respectivamente) fue similar al del grupo 2. Esto indica que 497C-T2 es tan potente como CDDP para reducir la actividad tumoral cuando se emplea como monoterapia. Pero de forma más importante, una biterapia que emplea 497C-T2 y CDDP aumenta en 20 veces el DT en los animales de los grupos 5 y 6 ($25,02 \pm 29,89$, y $20,07 \pm 9,28$ días, respectivamente), comparado con el DT medido en ratones del grupo 1 tratado con vehículo. Esto también confirma la potente actividad antitumoral de la sustancia ensayada 497C-T2 cuando se emplea sola o en combinación con CDDP.

Tal como se muestra en la tabla 9, las medidas de MRTV confirmaron que los animales del grupo 6 presentaron la mayor disminución en el volumen tumoral, a ambas concentraciones ensayadas (grupo 5, 6). El tratamiento solo con 497C-T2 condujo a una MRTV en D28 de 7,37 (grupo 3) o 6,76 (grupo 4), y el tratamiento con cisplatino condujo a una MRTV de 4,88 (grupo 2).

Todos estos resultados confirman que 497C-T2 es un potente agente antitumoral, tanto si se emplea por sí solo o en combinación sinérgica con cisplatino.

Ejemplo 8: Ensayo de 497C-T2 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico humano (CALU-6) en ratones atímicos de raza Swiss *in vivo*

Preparación de las células CALU-6

Se cultivaron células CALU-6 como células adherentes en medio EMEM completo (referencia CM1MEM18-01, nº de lote 462502, Eurobio, Francia), con suero de ternera fetal al 10% (FCS, referencia CVFSVF00-01, nº de lote S13021, Eurobio, Francia) a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Se amplificaron en matraces de 75 cm² hasta alcanzar 90×10^6 células.

En D0, las células CALU-6 (carcinoma de pulmón humano) se recogieron de matraces de 75 cm² retirando el medio y añadiendo 3 ml de tripsina-EDTA (referencia CEZTDA00-0U, nº de lote 633920, Eurobio, Francia). Después de 5 min de incubación a 37 °C las células se desprendieron del plástico y la reacción enzimática se detuvo añadiendo 3 ml de medio EMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%. Las células entonces se centrifugaron a 700 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendieron en medio de cultivo EMEM sin suero. Las células se contaron y se evaluó la

viabilidad mediante exclusión de azul de tripano (referencia CSTCOL03-OU, nº de lote 434511, Eurobio, Francia). El número de células CALU-6 viables fue > 99%. El número de células entonces se ajustó a 25×10^6 células/ml en medio sin suero.

Tabla 8: Control del crecimiento tumoral de NCI H460 humanas en ratones afímicos después de un tratamiento por vía intraperitoneal con vehículo, 497C-T2 (10 mg/kg y 18 mg/kg) y CDDP (5 mg/kg). MTV: media del volumen tumoral; T/C: proporción de volumen tumoral en grupos tratados/vehículo; DT: tiempo de duplicación del volumen tumoral. a: p<0,05 frente a G1; b: p<0,05 frente a G2; c: p<0,05 frente a G3; d: p<0,05 frente a G4.

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis de tratamiento (mg/kg)	MTV en D14 (mm ³)	MTV en D24 (mm ³)	MTV en D28 (mm ³)	T/C en D14 (%)	T/C en D24 (%)	T/C en D28 (%)	DT (días)
1	Vehículo-lote C	0	999,64 ± 443,46	3222,36 ± 494,51	4440,68 ± 1135,16	100	100	100	1,23 ± 0,49
2	CDDP	5,0	513,35 ± 333,36	1083,74 ± 899,44	1440,18 ± 1097,29 ^a	51,53	33,63	32,43	5,12 ± 2,89
3	497C-T2-lote A	10,0	571,00 ± 306,73	1955,02 ± 1687,55	2481,61 ± 2075,18	57,12	60,67	55,88	4,08 ± 1,4
4	497C-T2-lote A	10,0	468,85 ± 250,00	2289,22 ± 1170,70	3167,34 ± 1680,99	46,90	71,04	71,32	5,9 ± 1,21
5	497C-T2-lote A + CDDP	10,0 5,00	388,79 ± 315,14	671,93 ± 570,47 ^a	807,43 ± 692,22 ^{a,c}	38,89	20,85	18,18	25,02 ± 29,89
6	497C-T2-lote B + CDDP	18,00 5,00	459,45 ± 166,55 ^a	561,71 ± 218,34 ^{a,b,c,d}	638,74 ± 415,53 ^{a,b,c,d}	45,96	17,43	14,38	20,07 ± 9,28

Tabla 9: Media relativa del volumen tumoral (MRTV) de animales que portan el tumor NCI H460 y tratados con vehículo (grupo 1), CDDP sólo (grupo 2), 497C-T2 administrado en días alternos (grupo 3) o una vez diaria (grupo 4), y CDDP combinado con 497C-T2 a la dosis menor (grupo 5) y a la dosis mayor (grupo 6).

	D12	D14	D16	D18	D20	D22	D24	D26	D28
Grupo 1	1,00	3,18	4,39	6,87	9,28	11,61	9,73	14,15	19,50
Grupo 2	1,00	1,59	1,74	2,30	2,29	3,39	3,67	3,67	4,88
Grupo 3	1,00	1,37	1,70	2,46	2,81	3,30	3,22	5,80	7,37
Grupo 4	1,00	1,08	1,00	1,69	2,63	3,08	3,08	4,89	6,76
Grupo 5	1,00	1,01	1,18	1,34	1,75	2,18	1,80	2,04	2,45
Grupo 6	1,00	1,24	1,06	0,89	1,07	1,18	1,17	1,30	1,48

Inducción de tumores

- 5 Se anestesiaron 30 ratones sanos *Nude* de raza Swiss hembra mediante una inyección intraperitoneal de quetamina-xilazina (80 mg/kg-12 mg/kg, referencia K-113, Sigma, Francia). Después las células CALU-6 (5×10^6 células/ratón en 200 μ l de medio sin suero) se implantaron de forma subcutánea en el flanco derecho de cada ratón. Los ratones se observaron durante 2 h después de la implantación.

Programa de tratamiento

- 10 En D12 tras la implantación de las células CALU-6, los treinta ratones se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos de 5 ratones. El volumen de los tumores había alcanzado 228 a 468 mm³, y la media del volumen de los tumores no fue estadísticamente diferente entre los grupos después de la aleatorización.
- El programa de tratamiento, que comenzó en D12 y finalizó en D28, se resume en la tabla 10.
- Los animales del grupo 1 se trataron con la disolución del vehículo (Tris-HCl, pH 7,5, urea 2 M, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,1 mM (lote C).
 - Los animales del grupo 2 se trataron con una disolución de cisplatino en suero fisiológico 0,5 ml/ml (CDDP, dicloruro de cis-diaminoplatino(II), referencia P4394, nº de lote 014K0993, Sigma, Francia, pureza del 100%, P.M. 300).
 - 15 - Los animales del grupo 3 se trataron con el vehículo suplementado con la sustancia de ensayo 497C-T2 a una dosis de 10 mg/kg.
 - Los animales del grupo 4 se ensayaron con el vehículo suplementado con la sustancia de ensayo 497C-T2 a una dosis de 10 mg/kg, y también recibieron CDDP.
- 20 Las inyecciones en los grupos 1, 2, 3, y 4 se realizaron según el programa Q2DX8, es decir, 1 cantidad cada dos días, ocho veces.
- El CDDP se resuspendió en suero fisiológico estéril a una concentración de 0,5 mg/ml y se inyectó por vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/kg en un volumen de 10 ml/kg, según el programa de tratamiento Q2DX8.
- 25 Los ratones se observaron durante 2 h después de la inyección. Se empleó quetamina/xilazina (80 mg/kg-12 mg/kg, referencia K-113, Sigma, Francia) para anestesiar a los animales antes de su sacrificio mediante dislocación cervical. Para todos los animales, el tamaño tumoral se midió dos veces a la semana con calibradores. El volumen tumoral (mm³) se midió según la fórmula: (longitud x anchura²)/2 (4).

Estudios estadísticos

- Se calculó la media de los volúmenes tumorales (MTV), la media del volumen tumoral relativo (MRTV), y la inhibición del crecimiento tumoral (T/C) como en el ejemplo 7.
- 30 *Peso corporal*
- Tal como se muestra en la tabla 11, el vehículo no provoca ningún impacto: el comportamiento y la ganancia de peso corporal de los ratones fueron normales y ningún animal murió de forma prematura (excepto el ratón 5 del grupo 1). No se observó toxicidad durante el desarrollo del tratamiento con la sustancia de ensayo 497C-T2 a la dosis de 10 mg/kg, y se observó una ligera ganancia de peso corporal (+1,44 g).
- 35 En contraste, se observó una importante toxicidad en los grupos 2, 4 tratados con CDDP (12,6% y 8,7% de pérdida de peso corporal, respectivamente). La diferencia entre el grupo 1 frente al 2 y 4, y del grupo 3 frente al 2 y 4 era estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) pero la diferencia entre el grupo 2 y 4 no era estadísticamente significativa.

Tabla 10

Grupo	n° de animales	Tratamiento	Vía de administración	Dosis de tratamiento (mg/kg/adm)	Volumen de administración	Programa de tratamiento
1	5	Vehículo	intraperitoneal	0	10 ml/kg	Q2DX8
2	5	Cisplatino	intraperitoneal	5		Q2DX8
3	5	497C-T2	intraperitoneal	10		Q2DX8
4	5	497C-T2 y cisplatino	intraperitoneal	10		Q2DX8
				5		Q2DX8

Tabla 11: Peso corporal medio (MBW) de los ratones que portan tumores CALU-6 tratados con el vehículo, CDDP a 5 mg/kg (programa Q2DX8, G2), 497C-T2 a 10,0 mg/kg (programa Q2DX8, G3), combinación de 497C-T2 a 10,0 mg/kg y CDDP a 5 mg/kg (programa Q2DX8, G4) en D12 y D28.

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis de tratamiento (mg/kg)	MBW en D12 (g)	MBW en D28 (g)	MBWC D12-D18 (g)
1	Vehículo	0	22,35 ± 1,17	24,40 ± 1,14	+2,04
2	Cisplatino	5,00	21,39 ± 0,85	18,69 ± 1,97	-2,70
3	497C-T2	10,0	21,67 ± 1,32	23,11 ± 1,97	+1,44
4	497C-T2 + cisplatino	10,0 5,00	21,94 ± 0,74	19,84 ± 1,89	-2,11

Los resultados de los parámetros de la media del volumen tumoral (MTV), la media relativa del volumen tumoral (MRTV), el volumen tumoral y el crecimiento tumoral se muestran en las figuras 6, 7 y en la tabla 12 y la tabla 13.

La MTV disminuyó en D28 en los ratones del grupo 2 tratados con CDDP ($742,44 \pm 215,85 \text{ mm}^3$) comparado con los ratones del grupo 1 con vehículo ($1.233,44 \pm 663,82 \text{ mm}^3$). La MTV en D28 también disminuyó en el grupo 3 tratado con la sustancia de ensayo 497C-T2 a 10 mg/kg con una inyección cada dos días ($813,70 \pm 439,00 \text{ mm}^3$). Estos resultados fueron confirmados por el análisis de la MRTV en D28 (tabla 13). Se observó una fuerte reducción en la MTV en los animales del grupo 4 ($430,89 \pm 290,89 \text{ mm}^3$) comparado con el grupo 1, los animales tratados con vehículo ($1.233,44 \pm 663,82 \text{ mm}^3$).

La diferencia entre el grupo 1 y los dos grupos tratados con la sustancia de ensayo alcanza la significancia estadística ($p < 0,0001$ frente a 4; $p = 0,003$ frente a 3). La diferencia entre el grupo 2 y 4 también fue significativa ($p = 0,001$). En contraste, no se observó diferencia estadística entre el grupo 2 (sólo CDDP) y el grupo 3 (sólo 497C-T2). La primera significancia estadística entre el grupo 1 y el grupo tratado se observó, respectivamente, en D22 para el grupo 3, y en D20 para el grupo 4. Estos resultados fueron confirmados por el análisis de la MRTV en D28 (tabla 13). Se observó una reducción importante en la MTV en los animales del grupo 4 ($430,89 \pm 290,89 \text{ mm}^3$) comparado con el grupo 1, los animales tratados con vehículo ($1.233,44 \pm 663,82 \text{ mm}^3$).

Tabla 12: Inhibición del crecimiento basado en la proporción T/C

	Proporción T/C (%)							
Día	D14	D16	D18	D20	D22	D24	D26	D28
G2	-70%	24%	-6%	17%	11%	15%	45%	27%
G3	10%	33%	7%	13%	26%	24%	39%	27%
G4	22%	39%	8%	28%	30%	41%	60%	64%

La proporción T/C (tabla 12), que es un parámetro de la inhibición del crecimiento tumoral, revela una ligera actividad antitumoral de la sustancia de ensayo cuando se emplea como monoterapia, puesto que reduce en 27% el tamaño tumoral comparado con el grupo 1 tratado con vehículo. Sin embargo, cuando se combina con CDDP, la tasa de inhibición alcanza una reducción del 64% en el tamaño tumoral con relación al grupo 1 tratado con vehículo. Estos resultados demuestran directamente que 497C-T2 tiene una potente actividad antitumoral cuando se emplea en combinación con un agente citotóxico, tal como CDDP.

Tabla 13: Media relativa del volumen tumoral (MRTV) de animales que portan células NCI H-460 y que han sido tratados con vehículo (grupo 1), sólo con CDDP (grupo 2), 497C-T2 (10,0 mg/kg) (grupo 3), o una combinación de 497C-T2 y CDDP (grupo 4) según el programa de tratamiento Q2DX8.

MRTV									
Grupo	D12	D14	D16	D18	D20	D22	D24	D26	D28
1	1	1,83	3,17	2,51	3,68	4,16	5,68	7,49	8,24
2	1	3,11	2,39	2,66	3,08	3,70	4,84	4,11	5,98
3	1	1,64	2,11	2,34	3,22	3,09	4,31	4,60	6,02
4	1	1,42	1,92	2,32	2,66	2,89	3,33	2,96	2,96

Tal como se muestra en la tabla 13, la MRTV alcanza 2,96 en D28 para los animales del grupo 4, lo cual confirma la eficacia sinérgica de 497C-T2 con el cisplatino. Además, el cisplatino utilizado solo (grupo 2) o 497C-T2 utilizado solo (grupo 3) mostraron una MRTV muy parecida en D28, lo cual sugiere que 497C-T2 también es un potente agente antitumoral de monoterapia.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA
 <120> Fármaco, medicamento, composición antitumorales y su uso
 <130> BCT080062
- 10 <160> 37
 <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
 <211> 1801
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1

ES 2 385 115 T3

```

cttccccctc ccgcgcgccc gcccgccgcc tgccgcgccc gcccgccgcg ccgagagctct 60
gtagtatggc atcgaggaga atggagacca aacctgtgat aacctgtctc aaaaccctcc 120
tcatcatcta ctcttcgctc ttctggatca ctgggggtgat cctgctggct gttggagctct 180
ggggcaaaact tactctgggc acctatatct cccttattgc cgagaactcc acaaatgctc 240
cctatgtgct catcggaact ggcaccacta ttgttgtctt tggcctgttt ggatgctttg 300
ctacatgtcg tggtagccca tggatgctga aactgtatgc catgtttctg tccctgggtgt 360
tcctggctga gctcgtagct ggcatttcag ggtttgtgtt tcgtcatgag atcaaggaca 420
ccttcctgag gacttacacg gacgctatgc agacttacaa tggcaatgat gagaggagcc 480
gggcagtgga ccatgtgcag cgcagcctga gctgctgtgg tgtgcagaac tacaccaact 540
ggagcaccag cccctacttc ctggagcatg gcatccccc cagctgctgc atgaacgaaa 600
ctgattgtaa tccccaggat ctacacaatc tgactgtggc cgccaccaa gttaaccaga 660
agggttgtta tgatctggta actagtttca tggagactaa catgggaatc atcgctggag 720
tggcgtttgg aatcgcattc tcccagttaa ttggcatgct gctggcctgc tgtctgtccc 780
ggttcatcac ggccaatcag tatgagatgg tgtaaggaga agtctttcaa gaatgacgga 840
ataagagacc tgttttaaaa aggaactgca gcaatctttg aaagacttcc aaagaatggt 900
agagcacagt acataataca cttgccctgc tccctctccc cttaccca caacgtgcaa 960
ctgacactcc caccagctct ctgctccacc tttcagccca cgtcacgtgt agtgtccatt 1020
ttgtgaagcc ctgttgtgcc acagagtgtg gccagggtccc cctgcagcta gtcctagtga 1080
acctcacccc gaggccctgc atgggccagc cctccatct gtacttggtc caactgcaac 1140
tcatcatcgg tgactgggta tcacaccatc gctggccctt ttgggccctg catgtagtgt 1200
gggaggctcc tgtagctcc tcaactgtgg aaatgccaca cacctttaag tagataagca 1260
gacgatagtt atctgttctt ttgacttaat ctcatgttgt ttgattttcc ctctactaag 1320
gctttcctac cttcttcagg ctgcctaaga catgtaacga aacacttcaa taattgtcca 1380
tgaggagaaa aaaagcatgt gtcatgcatg aaggaaactg aacttgaggt ggccctcttg 1440
cttgttacat acctgggtat gtgtaggcag tttagtgcac ctttgcctct cggttgaaac 1500
ctgtataacc ctgttacaaa gctgtgttgt tgcttcttgt gaaggccatg atattttgtt 1560

tttcccaat taattgctat tgtgttattt tactacttct ctctgtattt tttcttgcat 1620
tgacattata gacattgagg acctcatcca aacaatttaa aaatgagtgt gaagggggaa 1680
caagtcaaaa tttttttaa agatcttcaa aagtaatgcc tctgtctagc atgccaacaa 1740
gaatgcattg atattgtgaa ctttgtgat atatgtatta ataaatagag caattacaag 1800
c 1801

```

5 <210> 2
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 385 115 T3

Met Glu Thr Lys Pro Val Ile Thr Cys Leu Lys Thr Leu Leu Ile Ile
 1 5 10 15
 Tyr Ser Phe Val Phe Trp Ile Thr Gly Val Ile Leu Leu Ala Val Gly
 20 25 30
 Val Trp Gly Lys Leu Thr Leu Gly Thr Tyr Ile Ser Leu Ile Ala Glu
 35 40 45
 Asn Ser Thr Asn Ala Pro Tyr Val Leu Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ile
 50 55 60
 Val Val Phe Gly Leu Phe Gly Cys Phe Ala Thr Cys Arg Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Trp Met Leu Lys Leu Tyr Ala Met Phe Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala
 85 90 95
 Glu Leu Val Ala Gly Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys
 100 105 110
 Asp Thr Phe Leu Arg Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly
 115 120 125
 Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser
 130 135 140
 Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe
 145 150 155 160
 Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys
 165 170 175
 Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn
 180 185 190
 Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe Met Glu Thr Asn Met
 195 200 205
 Gly Ile Ile Ala Gly Val Ala Phe Gly Ile Ala Phe Ser Gln Leu Ile
 210 215 220
 Gly Met Leu Leu Ala Cys Cys Leu Ser Arg Phe Ile Thr Ala Asn Gln
 225 230 235 240
 Tyr Glu Met Val

5 <210> 3
 <211> 112

ES 2 385 115 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg
1      5      10      15

Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser
      20      25      30

Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln
      35      40      45

Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile
      50      55      60

Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu
65      70      75      80

His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr
      85      90      95

Asp Leu Val Thr Ser Phe Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly
5      100      105      110
  
```

<210> 4
<211> 74
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser
1      5      10      15

Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met
      20      25      30

Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala
      35      40      45

Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe
      50      55      60
  
```

```

Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly
65      70
  
```

<210> 5
<211> 49
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp
1 5 10 15

Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys
20 25 30

Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala
35 40 45

Gly

<210> 6

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val
1 5 10 15

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

Phe Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly
35 40

<210> 7

<211> 1051

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (59)..(59)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (702)..(702)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (832)..(832)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (841)..(841)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (858)..(858)

<223> n es a, c, g o t

5	<220> <221> característica_misclánea <222> (862)..(862) <223> n es a, c, g o t
10	<220> <221> característica_misclánea <222> (869)..(869) <223> n es a, c, g o t
15	<220> <221> característica_misclánea <222> (891)..(891) <223> n es a, c, g o t
20	<220> <221> característica_misclánea <222> (910)..(910) <223> n es a, c, g o t
25	<220> <221> característica_misclánea <222> (918)..(918) <223> n es a, c, g o t
30	<220> <221> característica_misclánea <222> (922)..(922) <223> n es a, c, g o t
35	<220> <221> característica_misclánea <222> (942)..(942) <223> n es a, c, g o t
40	<220> <221> característica_misclánea <222> (965)..(965) <223> n es a, c, g o t
45	<220> <221> característica_misclánea <222> (991)..(991) <223> n es a, c, g o t
50	<220> <221> característica_misclánea <222> (1008)..(1008) <223> n es a, c, g o t
55	<220> <221> característica_misclánea <222> (1015)..(1015) <223> n es a, c, g o t
60	<220> <221> característica_misclánea <222> (1042)..(1042) <223> n es a, c, g o t
	<220> <221> característica_misclánea

ES 2 385 115 T3

<222> (1048)..(1048)
<223> n e s a, c, g o t

<400> 7

5

```
tgtgagcgga tacattcccc tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatnc      60
atatgcacca tcatcatcat cattcttctg gtctgggtgcc acgcggttct ggtatgaaag      120
aaaccgctgc tgctaaattc gaacgccagc acatggacag cccagatctg ggtaccgatg      180
acgacgacaa gatttcaggg tttgtgtttc gtcatgagat caaggacacc ttcctgagga      240
cttacacgga cgctatgcag acttacaatg gcaatgatga gaggagccgg gcagtggacc      300
atgtgcagcg cagcctgagc tgctgtggtg tgcagaacta caccaactgg agcaccagcc      360
cctacttcct ggagcatggc atccccccca gctgctgcat gaacgaaact gattgtaatc      420
cccaggatct acacaatctg actgtggccg ccaccaaagt taaccagaag ggttgttatg      480
atctggtaac tagtttcatg gagactaaca tgggaatcat cgctggagac cgggcttctc      540
ctcaaccatg gcgatatcgg atccgaattc tagctccgtc gacaagcttg cggccgcact      600
cgagcaccac caccaccacc actgagatcc ggctgctaac aaagcccgaa aggaagctga      660
gttggctgct gccaccgctg agcaataact agcataaccc cntggggcct ctaaacgggt      720
cttgaggggt tttttgctga aaggaggaac tatatccgga ttggcgaatg ggacgcgccc      780
tgtagcggcg cataaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac gnctaacttg      840
ncagcgcctt agcgcctcct cntttcgcct ttcttccctt cctttctcgc ncgtttcgcc      900
ggctttcccn gtcagctnta antcgggggg ctcccttagg gntccattta gtgctttacg      960
gcccncaccc caaaaacttg attaagggtga ngggttcccg aatgggcntc ccccntgata     1020
acggtttttc ccctttgacg tngagtcnct t                                     1051
```

<210> 8
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<220>
<221> característica_misclánea
<222> (188)..(188)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15

<400> 8

```
Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
1          5          10         15

Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp
20         25         30

Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ile Ser Gly Phe Val
35         40         45
```

Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg Thr Tyr Thr Asp Ala
 50 55 60
 Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His
 65 70 75 80
 Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp
 85 90 95
 Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys
 100 105 110
 Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val
 115 120 125
 Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser
 130 135 140
 Phe Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly Asp Arg Ala Ser Pro
 145 150 155 160
 Gln Pro Trp Arg Tyr Arg Ile Arg Ile Leu Ala Pro Ser Thr Ser Leu
 165 170 175
 Arg Pro His Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Xaa Ile Arg Leu Leu
 180 185 190
 Thr Lys Pro Glu Arg Lys Leu Ser Trp Leu Leu Pro Pro Leu Ser Asn
 195 200 205

Asn

5 <210> 9
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 9
 gacgacgaca agatttcagg gttgtgttt cgtcatgaga tcaa 44
 15 <210> 10
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 10
 gaggagaagc ccggtctcca gcgatgattc ccatgtt 37
 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 385 115 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 11
 5 gacgacgaca agatgcagcg cagcctgagc tgc 33
 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 12
 gacgacgaca agatccccc cagctgctgc atg 33
 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 gacgacgaca agatgaacga aactgattgt aatcccc 37
 20 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 14
 gacgacgaca agatggaccg ggcttctcct 30
 <210> 15
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 35 gaggagaagc ccggtctagt tattgctcag cgg 33
 <210> 16
 <211> 157
 <212> PRT
 40 <213> Macaca fascicularis
 <400> 16
 Met Phe Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Glu Leu Val Ala Gly Ile Ser
 1 5 10 15
 Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Asp Ala Met Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala
 35 40 45
 Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr
 50 55 60
 Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Asp His Gly Ile Pro Pro
 65 70 75 80
 Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn
 85 90 95

ES 2 385 115 T3

Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu
100 105 110

Val Thr Ser Phe Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly Val Ala
115 120 125

Phe Gly Ile Ala Phe Ser Gln Leu Ile Gly Met Leu Leu Ala Cys Cys
130 135 140

Leu Ser Arg Phe Ile Thr Ala Asn Gln Tyr Glu Met Val
145 150 155

5 <210> 17
<211> 52
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 17
Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro
1 5 10 15

Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr
20 25 30

Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys
35 40 45

10 Val Asn Gln Lys
50

<210> 18
<211> 54
<212> PRT
15 <213> artificial

<220>
<223> secuencia C-terminal

20 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (33)..(33)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25 <400> 18

ES 2 385 115 T3

Asp Arg Ala Ser Pro Gln Pro Trp Arg Tyr Arg Ile Arg Ile Leu Ala
1 5 10 15

Pro Ser Thr Ser Leu Arg Pro His Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr
20 25 30

Xaa Ile Arg Leu Leu Thr Lys Pro Glu Arg Lys Leu Ser Trp Leu Leu
35 40 45

Pro Pro Leu Ser Asn Asn

50

5 <210> 19
<211> 84
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys
1 5 10 15

Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu
20 25 30

Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn
35 40 45

Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln
50 55 60

Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe Met Glu Thr Asn Met Gly
65 70 75 80

10 Ile Ile Ala Gly

15 <210> 20
<211> 27
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 20
Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser
1 5 10 15

Phe Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly
20 25

20 <210> 21
<211> 32
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21

Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser
20 25 30

5

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 22

Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn
20 25

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

15

<213> homo sapiens

<400> 23

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
1 5 10 15

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn
20 25 30

20

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn
1 5 10 15

25

Pro Gln Asp Leu His
20

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> homo sapiens

30

<400> 25

Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala
1 5 10 15

Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly
20

35

<210> 26

<211> 50

<212> PRT

<213> homo sapiens

ES 2 385 115 T3

<400> 26

Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser
20 25 30

Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln
35 40 45

Asn Tyr
50

5

<210> 27

<211> 71

<212> PRT

10 <213> homo sapiens

<400> 27

Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser
20 25 30

Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln
35 40 45

Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile
50 55 60

Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn
65 70

15

<210> 28

<211> 80

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 28

ES 2 385 115 T3

Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser
20 25 30

Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln
35 40 45

Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile
50 55 60

Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu
65 70 75 80

<210> 29
<211> 94
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 29

Ile Ser Gly Phe Val Phe Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Asp Ala Met Gln Thr Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser
20 25 30

Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln
35 40 45

Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile
50 55 60

Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu
65 70 75 80

His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly
85 90

<210> 30
<211> 47
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 30

Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
20 25 30

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn
35 40 45

<210> 31
<211> 56
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 31

Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
20 25 30

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu
35 40 45

Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu
50 55

<210> 32
<211> 70
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 32

Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
20 25 30

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu
35 40 45

Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr
50 55 60

Lys Val Asn Gln Lys Gly
65 70

<210> 33
<211> 88
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 33

Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val Gln Arg
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
20 25 30

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu
35 40 45

Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr
50 55 60

Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe Met Glu
65 70 75 80

Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly
85

5 <210> 34
<211> 39
<212> PRT
<213> homo sapiens

10 <400> 34
Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
1 5 10 15

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu
20 25 30

Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp
35

15 <210> 35
<211> 50
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35

Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser Thr Ser
1 5 10 15

Pro Tyr Phe Leu Glu His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu
20 25 30

Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr
35 40 45

20 Lys Val
50

ES 2 385 115 T3

<210> 36
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 36
 Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Gln Asp
 1 5 10 15

Leu His Asn Leu Thr Val Ala Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly
 20 25 30

10

<210> 37
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

15

<400> 37
 Met Ala Ser Arg Arg Met Glu Thr Lys Pro Val Ile Thr Cys Leu Lys
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Ile Ile Tyr Ser Phe Val Phe Trp Ile Thr Gly Val Ile
 20 25 30

Leu Leu Ala Val Gly Val Trp Gly Lys Leu Thr Leu Gly Thr Tyr Ile
 35 40 45

Ser Leu Ile Ala Glu Asn Ser Thr Asn Ala Pro Tyr Val Leu Ile Gly
 50 55 60

Thr Gly Thr Thr Ile Val Val Phe Gly Leu Phe Gly Cys Phe Ala Thr
 65 70 75 80

ES 2 385 115 T3

Cys	Arg	Gly	Ser	Pro 85	Trp	Met	Leu	Lys	Leu 90	Tyr	Ala	Met	Phe	Leu 95	Ser
Leu	Val	Phe	Leu 100	Ala	Glu	Leu	Val	Ala 105	Gly	Ile	Ser	Gly	Phe 110	Val	Phe
Arg	His	Glu 115	Ile	Lys	Asp	Thr	Phe 120	Leu	Arg	Thr	Tyr	Thr 125	Asp	Ala	Met
Gln	Thr 130	Tyr	Asn	Gly	Asn	Asp 135	Glu	Arg	Ser	Arg	Ala 140	Val	Asp	His	Val
Gln 145	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys 150	Cys	Gly	Val	Gln	Asn 155	Tyr	Thr	Asn	Trp	Ser 160
Thr	Ser	Pro	Tyr	Phe 165	Leu	Glu	His	Gly	Ile 170	Pro	Pro	Ser	Cys	Cys 175	Met
Asn	Glu	Thr	Asp 180	Cys	Asn	Pro	Gln	Asp 185	Leu	His	Asn	Leu	Thr 190	Val	Ala
Ala	Thr	Lys 195	Val	Asn	Gln	Lys	Gly 200	Cys	Tyr	Asp	Leu	Val 205	Thr	Ser	Phe
Met	Glu 210	Thr	Asn	Met	Gly	Ile 215	Ile	Ala	Gly	Val	Ala 220	Phe	Gly	Ile	Ala
Phe 225	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly 230	Met	Leu	Leu	Ala	Cys 235	Cys	Leu	Ser	Arg	Phe 240
Ile	Thr	Ala	Asn	Gln 245	Tyr	Glu	Met	Val							

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polipéptido activo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:3, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:18 condensada con su C-terminal.
- 5 2.- El polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido tiene una actividad antitumoral.
- 3.- Un medicamento que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 4.- Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 5.- Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además al menos otra sustancia activa seleccionada de sustancias antiangiogénicas o sustancias antitumorales.
- 6.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que dicha sustancia activa es un complejo de platino seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino.
- 15 7.- Un medicamento según la reivindicación 3 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para su uso en el tratamiento del cáncer y/o tumores del cuerpo humano o animal.
- 8.- El medicamento según la reivindicación 3 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que está en una forma adecuada para la administración tópica, sistémica, oral, subcutánea, transdérmica, intramuscular o intraperitoneal.
- 20 9.- El medicamento según la reivindicación 3 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicho polipéptido está presente en una cantidad del 0,01% al 90% en peso, preferiblemente del 0,1% al 10% en peso, más preferiblemente del 1% al 5% en peso.
- 10.- El medicamento o la composición farmacéutica según la reivindicación 7, en el que los tumores son tumores sólidos.
- 11.- La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran de modo simultáneo.
- 25 12.- La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran de modo secuencial.
- 13.- La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran por vías distintas.

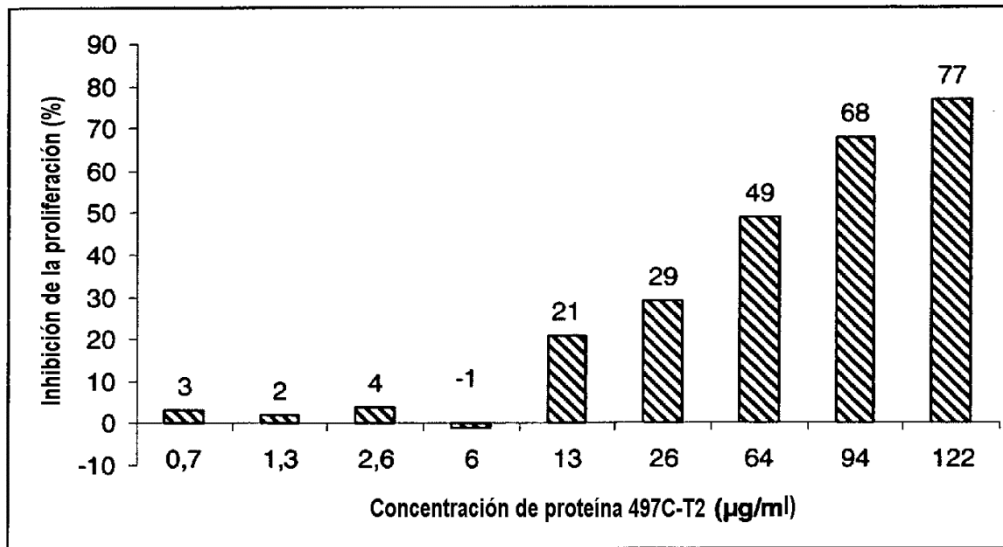


Figura 1

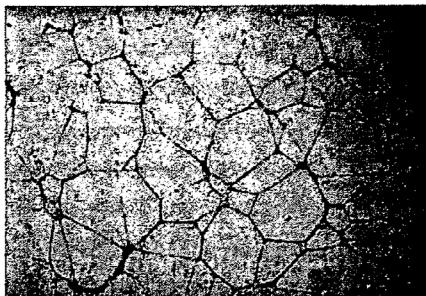


Fig. 2a

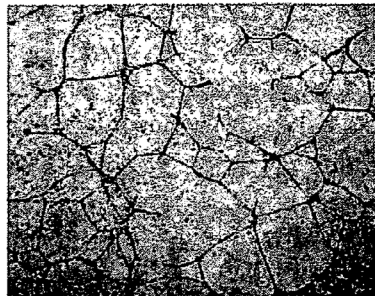


Fig. 2b

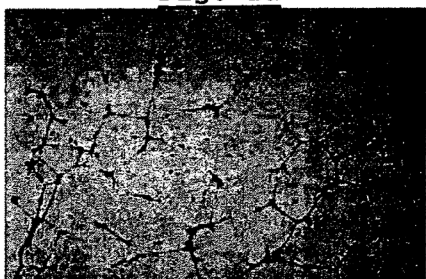


Fig. 2c

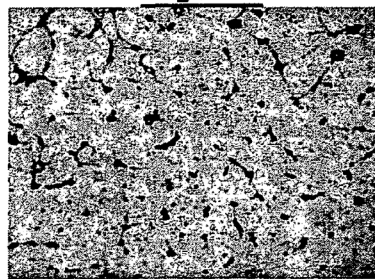


Fig. 2d

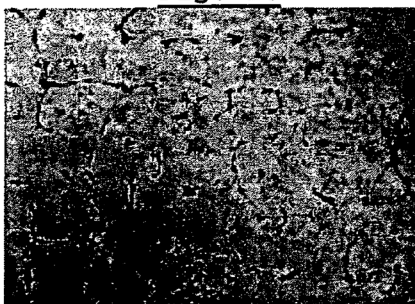


Fig. 2e

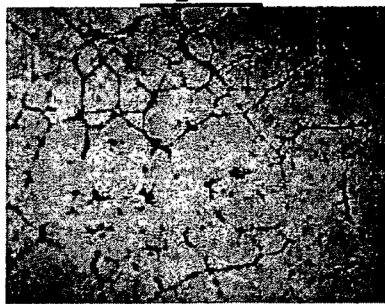


Fig. 2f

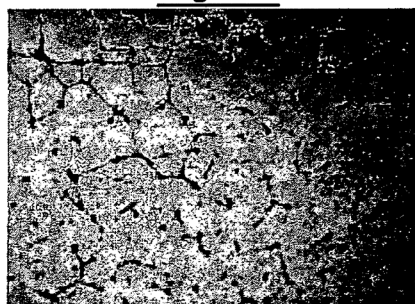


Fig. 2g

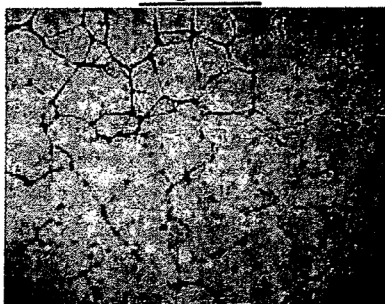


Fig. 2h

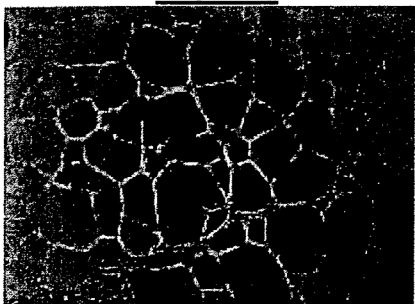


Fig. 2i

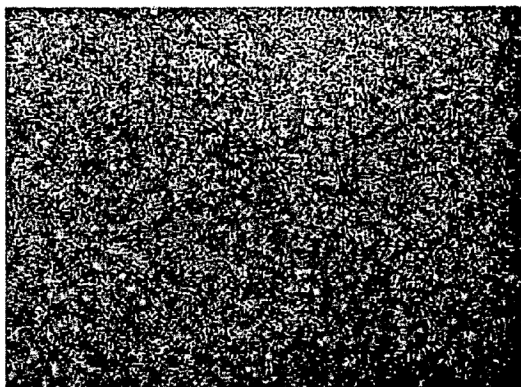


Fig. 3a

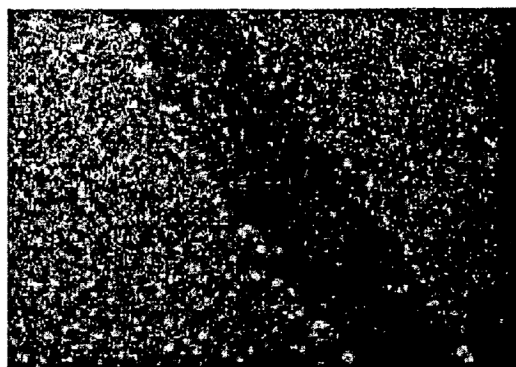


Fig. 3b

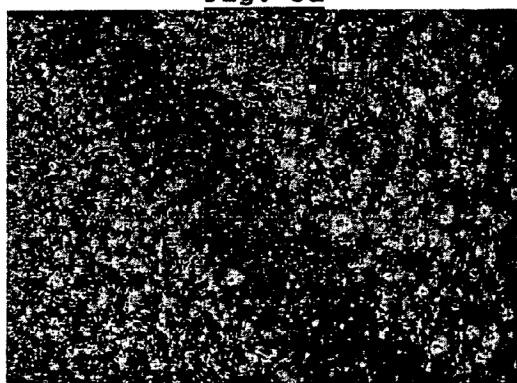


Fig. 3c

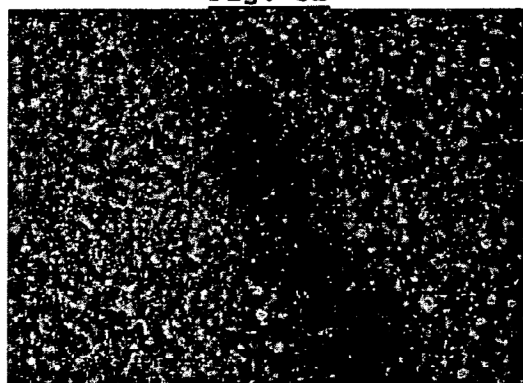


Fig. 3d

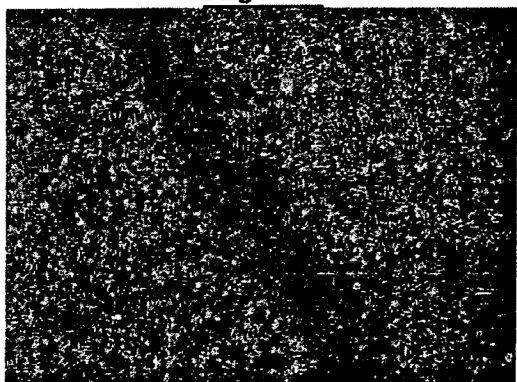


Fig. 3e

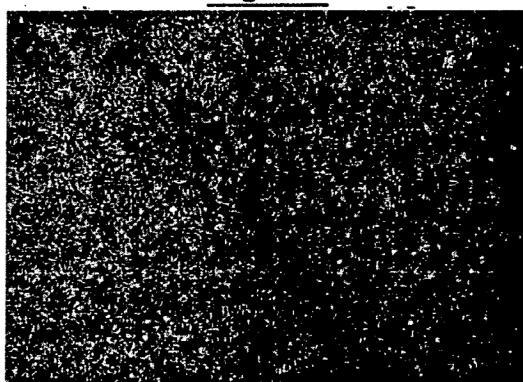


Fig. 3f

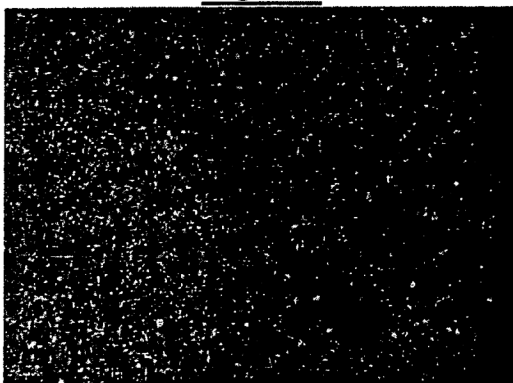


Fig. 3g

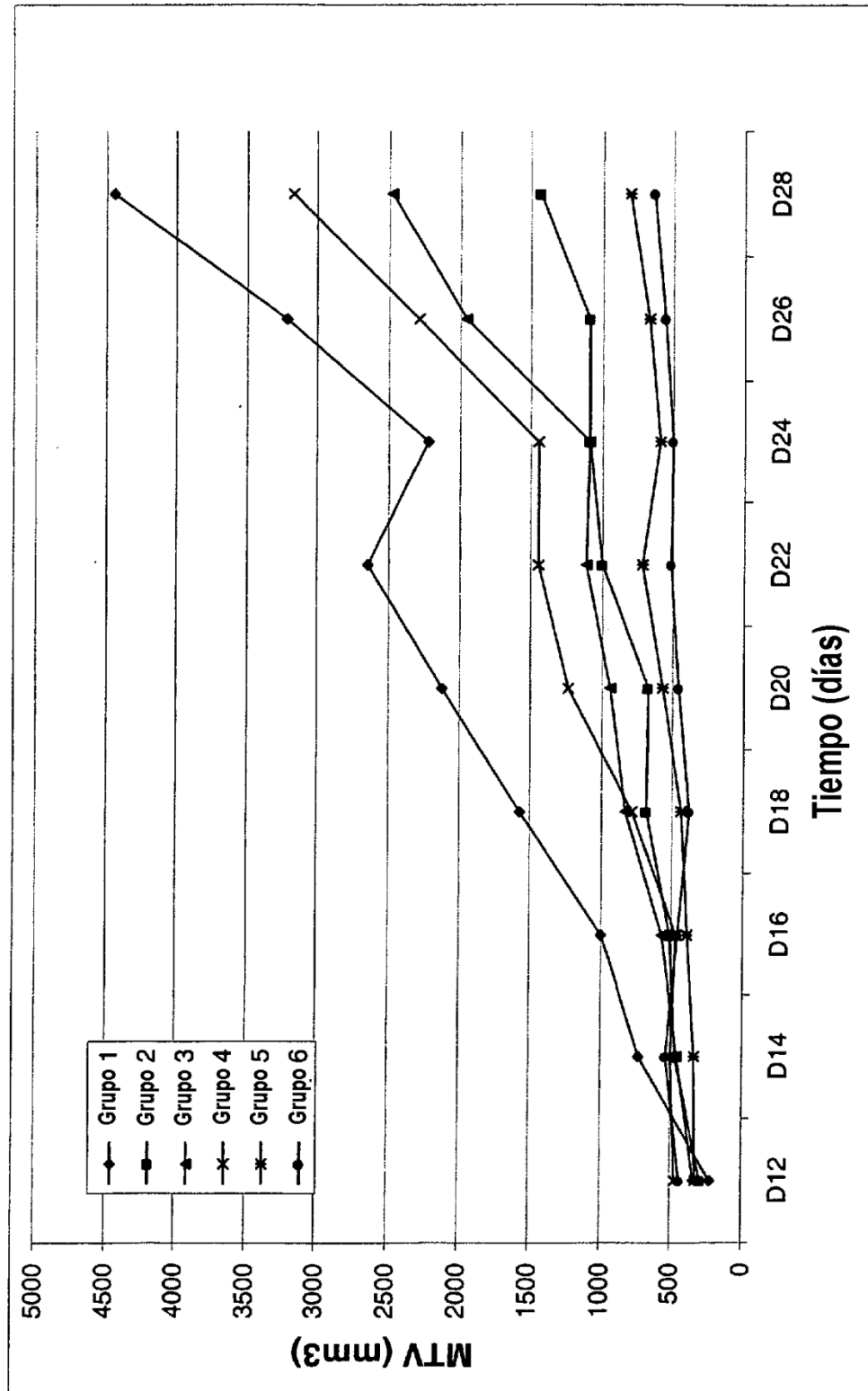


Figura 4

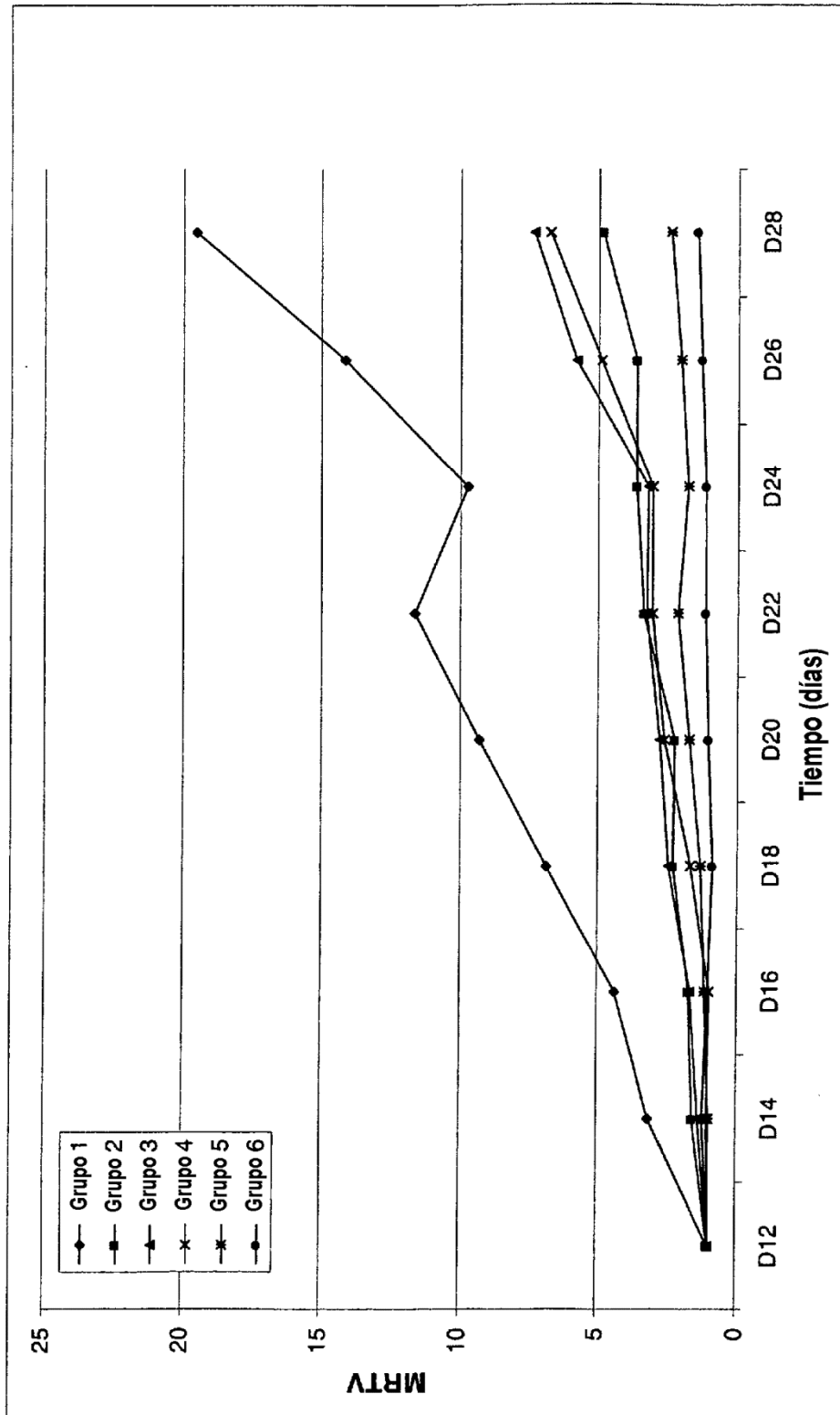


Figura 5

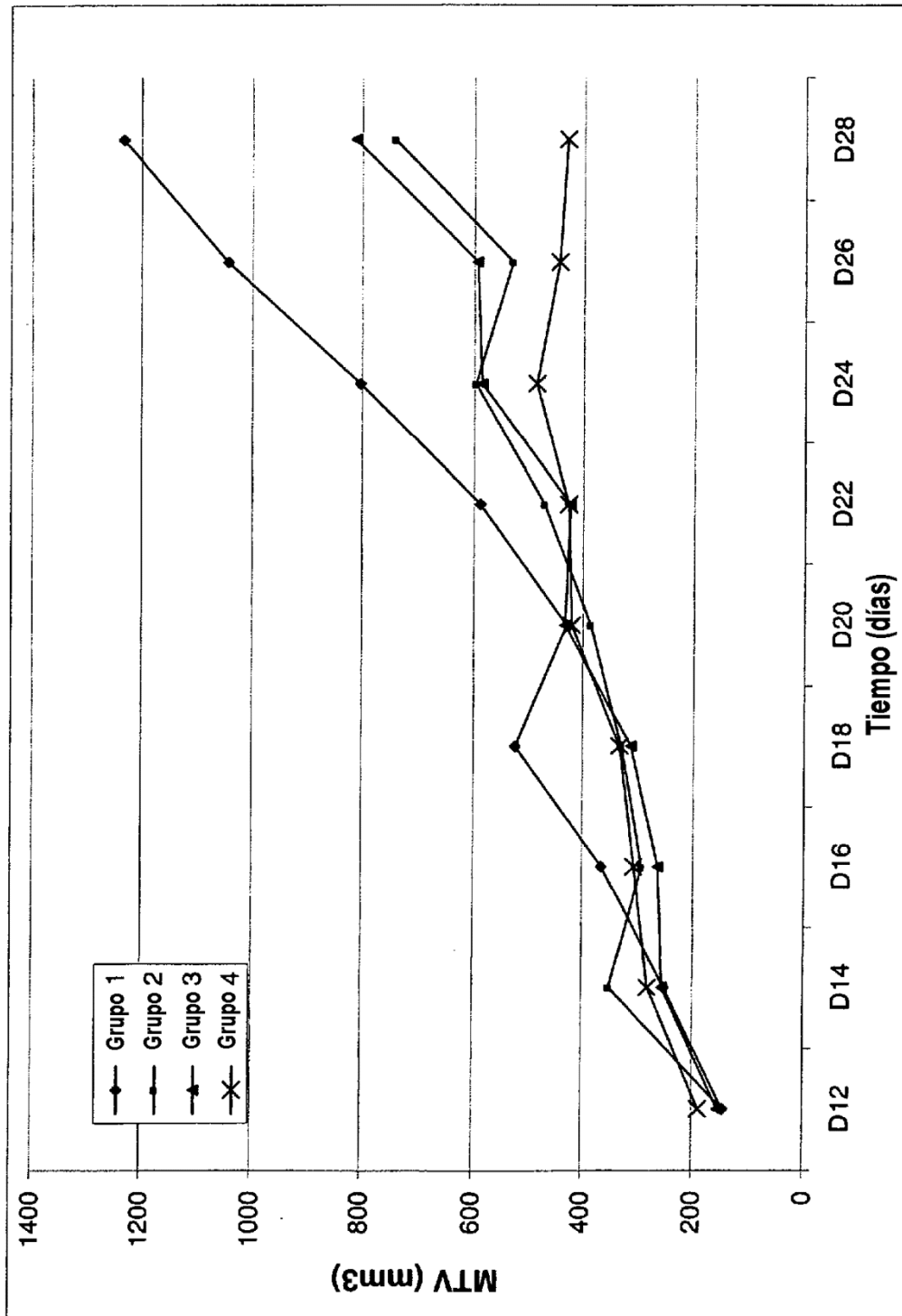


Figura 6

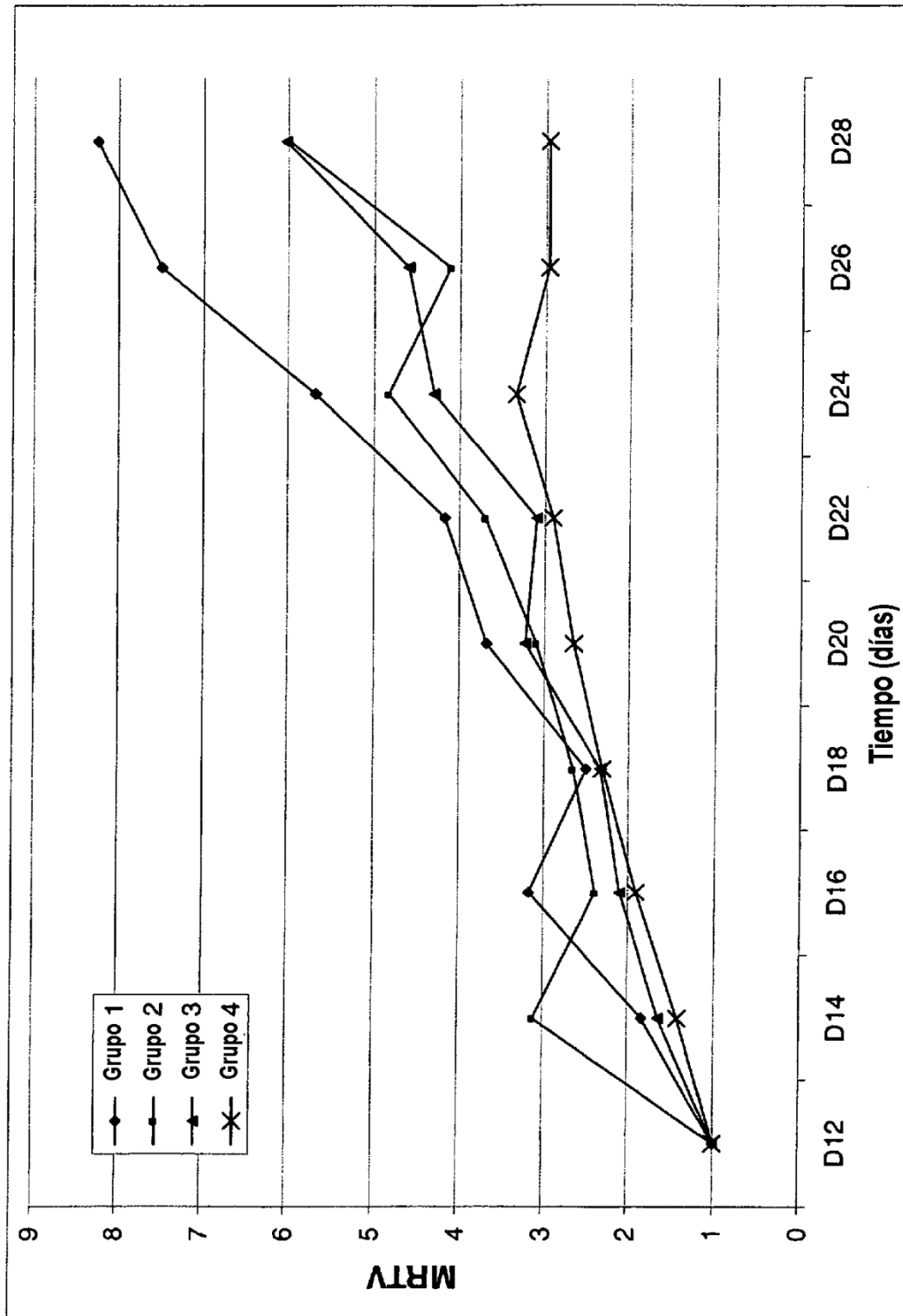


Figura 7