

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 922**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2004 E 04764346 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1660532**

54 Título: **Polipéptidos de fusión y su utilización para la terapia tumoral antivascolar**

30 Prioridad:

22.08.2003 DE 10338733

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2013

73 Titular/es:

**BERDEL, WOLFGANG (33.3%)
Raesfeldstrasse 40
48149 Münster , DE;
ONCOSCIENCE AG (33.3%) y
BIZIMIS, ARI, E. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BERDEL, WOLFGANG, E. y
MESTERS, ROLF, M.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 397 922 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de fusión y su utilización para la terapia tumoral antivascolar.

5 La presente invención se refiere a polipéptidos de fusión que comprenden, por lo menos, dos péptidos. Un péptido consiste en de 3 a 30 aminoácidos y permite que el polipéptido de fusión se una selectivamente a las células endoteliales de los vasos tumorales. El otro péptido consiste en factor tisular TF (Tissue Factor) o un fragmento del mismo, estando caracterizado dicho factor tisular y su fragmento porque pueden activar la coagulación sanguínea tras la unión del polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales. Los péptidos se pueden unir
10 entre sí directamente o a través de un conector que presenta hasta 15 aminoácidos. La presente invención se refiere además a la utilización de estas proteínas de fusión en la terapia antivascolar de enfermedades neoplásicas y a su utilización en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

Antecedentes de la invención

15 Una neovascularización adecuada es un prerrequisito para el crecimiento progresivo del tumor (1). La neoangiogénesis resulta necesaria, particularmente, para mantener el crecimiento expansivo del tumor, ya que únicamente una oxigenación suficiente puede garantizar el suministro de nutrientes al tumor y la eliminación de sus productos de degradación.

20 En la técnica de tratamientos tumorales anterior, se han desarrollado estrategias terapéuticas antivasculares dirigidas a la destrucción de los vasos sanguíneos del tumor y al infarto tumoral asociado, además de estrategias terapéuticas antiangiogénicas, que atacan el complejo proceso de crecimiento y diferenciación de los vasos sanguíneos.

25 Una condición previa para llevar a cabo estas estrategias es la identificación de las estructuras diana del endotelio vascular del tumor que no se presentan en las otras células endoteliales del tejido normal. Estas estructuras diana específicas se podrían utilizar para aplicar agentes citostáticos o determinadas toxinas a las células endoteliales vasculares del tumor y, en menor medida, a las células tumorales en sí.

30 Entre las estructuras diana que se pueden utilizar para este propósito se encuentran el bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos), el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y el VEGFR-2 (receptor 2 de VEGF), endoglina, endosialina, una isoforma de fibronectina (dominios ED-B), las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_1\beta_2$, aminopeptidasa N, proteoglicano NG2 y las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP 2 y 9) (2-13). Por ejemplo, Arap y otros (8) acoplaron péptidos que se unen específicamente a las integrinas alfa 1 a una sustancia activa que se estaba utilizando para quimioterapia en el estado de la técnica (doxorubicina). Se demostró en un modelo animal que el efecto antineoplásico de la doxorubicina se podía mejorar mediante el acoplamiento a los péptidos.

35 Un enfoque terapéutico antivascolar alternativo comprende la activación selectiva de la coagulación sanguínea en los vasos tumorales a fin de inducir la necrosis tumoral. Por ejemplo, se obtuvo un fragmento de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ y se dirigió contra el factor tisular truncado (truncated tissue factor, tTF) y un antígeno MHC de clase II. Tras la inducción experimental del antígeno en las células endoteliales del tumor, se pudo poner de manifiesto una terapia antivascolar mediante la administración del anticuerpo en un modelo de neuroblastoma murino (14 y 47). En un segundo estudio del mismo equipo, se utilizó un inmunocombinado que une selectivamente
45 el tTF a un marcador de origen natural del endotelio de los vasos tumorales, la VCAM-1 (molécula de adhesión de células vasculares 1) (15).

50 En un enfoque muy parecido, se fusionó un fragmento de anticuerpo (scFv), que es específico para el dominio oncofetal ED-B, con el tTF. Las proteínas de fusión generadas, scFv-tTF, dieron lugar a un infarto completo y selectivo en diversos tumores del modelo de ratón (16).

Alternativamente, el tTF se unió a un inhibidor del antígeno de membrana específico de la próstata (17). Esta proteína de fusión indujo una necrosis selectiva por infarto en un modelo de próstata de rata tras la administración intravenosa. La administración de esta proteína de fusión junto con una sustancia citotóxica (doxorubicina) en dosis
55 bajas dio lugar a la regresión masiva del tumor e incluso a su erradicación completa (17). Recientemente se han descrito otras proteínas de fusión de tTF que consisten en fragmentos de anticuerpo contra VEGFR, endoglina y VCAM-1 (18).

60 Sin embargo, las moléculas producidas para la terapia tumoral antivascolar según el estado de la técnica presentan desventajas. Particularmente, hay que suponer que, debido a su tamaño, dichas moléculas son inmunógenas. Por consiguiente, el tratamiento de mamíferos con estas moléculas desencadena una reacción inmunitaria contra las mismas, de tal modo que resulta imposible administrarlas de forma reiterada.

65 Además, el tamaño de la pareja de acoplamiento, a través de la cual se debe dirigir hacia el tejido tumoral la porción peptídica capaz de activar la coagulación sanguínea, puede provocar impedimentos estéricos a la formación del complejo enzima-sustrato macromolecular factor VIIa/FX, importante para la coagulación. La formación del complejo

también se puede ver obstaculizada si el péptido capaz de activar la coagulación sanguínea presenta una conformación modificada debido a las parejas de fusión relativamente grandes.

En el estado de la técnica (documento WO 03/035688), también se conocen polipéptidos de fusión en los que un dominio de unión selectiva, por ejemplo, un dominio de fibronectina que se une a las integrinas, que comprende por ejemplo péptidos RGD, o el dipéptido D-β-E, que se une a PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), se une al extremo N de un polipéptido del factor tisular. Aunque se demostró *in vitro* un efecto amidolítico y proteolítico, los constructos, incluso combinados con el factor VIIa, sólo exhibieron un efecto antitumoral *in vivo* extremadamente débil. Los animales sólo sobrevivieron más tiempo en combinación con doxiciclina.

Hu *et al.* (46) describen diversas proteínas de fusión y su utilización para la obtención de trombosis en los vasos tumorales, incluida una proteína de fusión de un oligopéptido de 9 aminoácidos que contiene la secuencia RGD, que se unió a la forma truncada del factor tisular. De nuevo, los péptidos RGD se unieron al extremo N del tTF y se obtuvo RGD-tTF. El análisis funcional puso de manifiesto que la proteína de fusión que contenía RGD no producía ninguna inhibición significativa del crecimiento tumoral.

Así, los constructos conocidos en el estado de la técnica se construyeron de tal modo que el dominio de unión selectiva estaba unido al extremo N del polipéptido del factor tisular. Incluso se subrayó que esta estructura era la que se debía escoger, ya que, basándose en modelos estructurales, el extremo N se consideraba un sitio particularmente favorable para la unión, lo que no inhibiría el inicio de la trombosis.

Sumario de la invención

Por consiguiente, teniendo en cuenta la técnica anterior, el problema consiste en dar a conocer sustancias trombotógenas alternativas que puedan inhibir eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*.

Ahora, este problema se ha resuelto mediante polipéptidos de fusión que comprenden un péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, lo que permite que el polipéptido de fusión se una selectivamente a las células endoteliales de los vasos tumorales, y el factor tisular TF (tissue factor) o un fragmento del mismo, caracterizándose el factor tisular y el fragmento porque son capaces de activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales, uniéndose dichos péptidos entre sí directamente o a través de un conector que presenta hasta 15 aminoácidos. El péptido, que permite que el polipéptido de fusión se una selectivamente a las células endoteliales de los vasos tumorales, está unido al extremo C del péptido, que puede activar la coagulación sanguínea, cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales. La presente invención se refiere además a medicamentos que contienen polipéptidos de fusión correspondientes y a su utilización para el tratamiento de tumores.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de la unión de las proteínas de fusión de tTF-RGD y tTF-NGR a $\alpha_v\beta_3$ y CD13. La selectividad tumoral se consigue gracias a la especificidad de la secuencia RGD para la integrina $\alpha_v\beta_3$ y de la secuencia NGR para CD13 (aminopeptidasa N). Estos receptores se expresan de forma selectiva y específica a alta densidad en las células endoteliales del tumor, pero no en el resto de células endoteliales del tejido normal (salvo algunas excepciones). La representación de las proteínas de fusión es muy esquemática y no proporciona ninguna información sobre su secuencia primaria.

Figura 2: Análisis por SDS-PAGE y transferencia Western de las proteínas de fusión recombinantes tTF₁₋₂₁₈ y tTF. La pureza del tTF y de las proteínas de fusión de tTF se determinó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie tras la extracción a partir de *E. coli* (BL21 DE3) y replegamiento en un gradiente lineal de urea (6M - 1M). La identidad de las proteínas se verificó por transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-factor tisular (clon V1C7, American Diagnostics). Carga en los carriles individuales: 1 = tTF; 2 = tTF-RGD; 3 = tTF-NGR; 4 = tTF-cycloNGR1; 5 = tTF-cycloNGR2; 6 = tTF-cycloNGR3; 7 = tTF-GALNGRSHAG; M = marcador de peso molecular.

Figura 3: Determinación de las constantes de Michaelis (Km) para la activación de FX por las proteínas de fusión FVIIa/tTF₁₋₂₁₈ o FVIIa/tTF₁₋₂₁₈. Los parámetros de la cinética de Michaelis-Menten se calcularon por el método descrito por Ruf (45).

Figura 4: Unión de tTF, tTF-RGD y tTF-NGR a la integrina $\alpha_v\beta_3$. La unión de tTF, tTF-RGD y tTF-NGR 0,1 μ M a $\alpha_v\beta_3$ inmovilizada se cuantificó con un anticuerpo policlonal contra el TF humano (American Diagnostica) en un ensayo ELISA. Los resultados se indican como mediana y rango intercuartílico. Las diferencias en la unión entre tTF-RGD y tTF o entre tTF-NGR y tTF fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$, ensayo de Mann-Whitney).

Figura 5: Especificidad de la unión de tTF-RGD a la integrina $\alpha_v\beta_3$. La unión de tTF-RGD (0,1 μ M) a $\alpha_v\beta_3$ inmovilizada se vio significativamente inhibida por la inhibición competitiva con el péptido sintético GRGDSP (1-10 μ M) ($p < 0,001$, ensayo de Mann-Whitney para las dos concentraciones de péptidos RGD).

Figura 6: Unión de tTF y tTF-RGD a células endoteliales humanas. A: Análisis FACS de células endoteliales incubadas con tTF 0,1 μ M (2) o con tTF-RGD 0,1 μ M (3) durante 60 min a 4°C. B: Se puso de manifiesto una reducción en la unión del 75% por inhibición competitiva de la proteína de fusión tTF-RGD con GRGDSP 1 μ M (4). Las curvas 1 en A y B muestran el control negativo.

5
Figura 7: Inhibición de un carcinoma de pulmón humano (CCL185) que se desarrolla como heterotrasplante en ratones lampiños atímicos por terapia intravenosa con proteínas de fusión de tTF (tTF-RGD, n = 6; tTF-NGR, n = 6) en comparación con el crecimiento tumoral con infusión de solución salina fisiológica (NaCl, n = 8) o tTF (n = 1). Las flechas verticales indican los instantes de inyección con las respectivas sustancias.

10
Figura 8: Inhibición y remisión parcial de un melanoma maligno humano (M21) que se desarrolla como heterotrasplante en ratones lampiños atímicos por terapia intravenosa con proteínas de fusión de tTF (tTF-RGD, n = 3; tTF-NGR, n = 3) en comparación con el crecimiento tumoral con infusión de solución salina fisiológica (NaCl, n = 4) o tTF (n = 4). Las flechas verticales indican los instantes de inyección con las respectivas sustancias.

15
Figura 9: Fotografía macroscópica *in vivo* de un ratón portador de tumor 20 min después de la inyección de la proteína de fusión tTF-NGR (A, mitad izquierda de la imagen) o de NaCl (A, mitad derecha de la imagen). La imagen macroscópica con coloración azulada pálida del tumor después de la inyección de tTF-NGR indica necrosis tumoral. Tras 60 min, los dos ratones se desangraron, se les extirpó el tumor en su totalidad y éste se sometió a un examen histológico. En B, se puede observar la imbibición hemorrágica del tumor tratado con tTF-NGR como un signo de hemorragia secundaria como resultado de una necrosis tumoral incipiente. En cambio, el tumor tratado con NaCl aparece vital (C).

20
Figura 10: Examen histológico del tumor de melanoma 1 hora después de la inyección intravenosa de tTF-RGD (A y B), tTF-NGR (C y D) y sal común (E y F) en la vena caudal del ratón lampiño portador del tumor. En los tumores tratados con las proteínas de fusión de tTF, los vasos sanguíneos aparecen tromboticamente ocluidos (flechas). Se observan extensas necrosis tumorales en la zona de suministro del vaso ocluido por un coágulo de sangre (A-D). Las fotografías son de zonas representativas de los tumores (A, C y E: aumento de 200x, B, D y F: aumento de 400x; tinción HE (tinción descrita, por ejemplo, en H.C. Burck, *Histologische Technik – Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*, 5ª edición, Thieme Verlag, Stuttgart, 1982, páginas 109 y siguientes).

25
Figura 11: Exámenes histológicos representativos del corazón (A), los riñones (B), el hígado (C) y el pulmón (D) 1 hora después de la inyección de 4 mg/kg de peso corporal de tTF-NGR. No se detectaron trombosis ni necrosis por microscopia en ninguno de estos órganos (tinción HE; aumento de 200x).

30
Figura 12: Secuencia de aminoácidos de factor tisular humano (TF).

35
Figura 13: Secuencia de aminoácidos del factor tisular humano truncado tTF₁₋₂₁₈ (abreviado tTF dentro del alcance de la presente solicitud).

Figura 14: Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tTF-GRGDSP (abreviado tTF-RGD).

40
Figura 15: Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tTF-GNGRAHA (abreviado tTF-RGD).

Figura 16: Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tTF-GALNGRSHAG.

Figura 17: Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tTF-GCNGRCG (abreviado tTF-cycloNGR1).

50
Figura 18: Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tTF-GCNGRCVSGCAGRC (abreviado tTF-cycloNGR2).

Figura 19: Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión tTF-GCVLNGRMEC (abreviado tTF-cycloNGR3).

55
Figura 20: Secuencia de nucleótidos del factor tisular humano truncado tTF₁₋₂₁₈ (abreviado tTF para mayor brevedad dentro del alcance de la presente solicitud).

Figura 21: Secuencia de nucleótidos del polipéptido de fusión tTF-GRGDSP (abreviado tTF-RGD).

60
Figura 22: Secuencia de nucleótidos del polipéptido de fusión tTF-GNGRAHA (abreviado tTF-RGD).

Figura 23: Secuencia de nucleótidos del polipéptido de fusión tTF-GALNGRSHAG.

Figura 24: Secuencia de nucleótidos del polipéptido de fusión tTF-GCNGRCG (abreviado tTF-cycloNGR1).

65

Figura 25: Secuencia de nucleótidos del polipéptido de fusión tTF-GCNGRCVSGCAGRC (abreviado tTF-cycloNGR2).

Figura 26: Secuencia de nucleótidos del polipéptido de fusión tTF-GCVLNGRMEC (abreviado tTF-cycloNGR3).

Figura 27: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF₁₋₂₁₈.

A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 28: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF-GRGDSP.

A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 29: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF-GNGRAHA.

A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 30: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF-GCNGRCG.

A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 31: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF-GCNGRCVSGCAGRC. A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 32: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF-GCVLNGRMEC.

A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 33: Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos para la producción de tTF-GALNGRSHAG.

A: 5'-cebador; B: 3'-cebador;

Figura 34: a: Inhibición y remisión parcial de un melanoma maligno humano (M21) que se desarrolla como heterotrasplante en ratones lampiños atímicos por terapia intravenosa con proteínas de fusión de tTF (tTF-RGD, n = 7) en comparación con el crecimiento tumoral con infusión de solución salina fisiológica (NaCl, n = 9) o tTF (n = 11). Las flechas verticales indican los instantes de inyección con las respectivas sustancias.

b: Inhibición de un fibrosarcoma humano (HT1080) que se desarrolla como heterotrasplante en ratones lampiños atímicos por terapia intravenosa con proteínas de fusión de tTF (tTF-RGD, n = 12) en comparación con el crecimiento tumoral con infusión de solución salina fisiológica (NaCl, n = 15) o tTF (n = 14). Las flechas verticales indican los instantes de inyección con las respectivas sustancias.

c: Inhibición de un carcinoma de pulmón humano (CCL185) que se desarrolla como heterotrasplante en ratones lampiños atímicos por terapia intravenosa con proteínas de fusión de tTF (tTF-RGD, n = 11) en comparación con el crecimiento tumoral con infusión de solución salina fisiológica (NaCl, n = 10) o tTF (n = 5). Las flechas verticales indican los instantes de inyección con las respectivas sustancias. Se determinó la significación estadística en cada caso con el ensayo de Mann-Whitney para grupos independientes, considerándose significativos los valores de P inferiores a 0,05. * indica la significación estadística de la diferencia entre tTF-RGD y el tampón.

Figura 35: Macrografía de un ratón portador de un tumor M21 al final del tratamiento (día 7) con la proteína de fusión tTF-RGD (A, C) o NaCl (B, D). Las diferencias de tamaño y aspecto de los tumores tratados con tTF-RGD, que a diferencia del tumor de control aparentemente vital muestran claros signos de necrosis, son fácilmente distinguibles.

Figura 36: Tinción H-E de tumores y órganos de ratones tratados con tTF-RGD y solución salina fisiológica.

Se observó trombosis grave y necrosis de las células tumorales en los animales tratados con tTF-RGD (A: 200x, B: 400x). Las flechas indican ejemplos de trombosis en vasos sanguíneos del tumor. No se produjo trombosis o necrosis aparente en los animales tratados con solución salina (C: 200x, D: 400x). Las flechas indican vasos sanguíneos intactos del tumor con algunos eritrocitos. El corazón (E), el pulmón (F), el hígado (G) y el riñón de los animales tratados con tTF-RGD no mostró ninguna trombosis o necrosis visible.

Figura 37: Acción de tTF-NGR en un modelo de fibrosarcoma.

Se examinaron ratones portadores de un fibrosarcoma (HT1080) por resonancia magnética (RMN) sin administración intravenosa de tTF-NGR (pre tTF-NGR) y 6 horas después de la misma (post tTF-NGR). Se indica la fracción de volumen vascular alta o baja.

Descripción detallada de la invención

Los problemas observados en la técnica anterior han sido superados mediante polipéptidos de fusión que comprenden los péptidos siguientes:

- a) un péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, que permiten unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales; y
- b) un factor tisular TF (Tissue Factor) o un fragmento del mismo, estando caracterizado dicho factor tisular o fragmento del mismo porque pueden activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales,

en el que los péptidos a) y b) están unidos entre sí directamente o mediante un conector que presenta hasta 15 aminoácidos, caracterizado porque el péptido, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales está unido al extremo C del péptido capaz de activar la coagulación sanguínea tras la unión del polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales. La presente invención se refiere además a medicamentos que contienen polipéptidos de fusión correspondientes y a su utilización para el tratamiento de tumores.

Además de las secuencias a) y b), los polipéptidos de fusión según la invención pueden comprender secuencias adicionales siempre que las mismas no tengan un efecto adverso en la conformación estérica del polipéptido de fusión y no obstaculicen la formación del complejo enzima-sustrato que desencadena la coagulación sanguínea. Los polipéptidos de fusión según la invención pueden contener, por ejemplo, secuencias de un His-Tag que simplifican la expresión recombinante y la purificación del péptido (véase los ejemplos). Sin embargo, la presencia de estas secuencias no es necesaria. Así pues, según una forma de realización preferente de la invención, el polipéptido de fusión comprende:

- a) un péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales; y
- b) un factor tisular TF (Tissue Factor) o un fragmento del mismo, caracterizándose dicho factor tisular o fragmento del mismo por su capacidad de activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales,

en el que los péptidos a) y b) están unidos entre sí directamente o mediante un conector que presenta hasta 15 aminoácidos,

Según una forma de realización particularmente preferente de la invención, el polipéptido de fusión comprende:

- a) un péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales; y
- b) un factor tisular TF (Tissue Factor) o un fragmento del mismo, estando caracterizado dicho factor tisular o fragmento del mismo por su capacidad de activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales,

en el que los péptidos a) y b) están unidos entre sí.

Según la presente invención, se ha puesto sorprendentemente de manifiesto que los polipéptidos de fusión de un péptido particularmente pequeño capaz de unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales, y un péptido capaz de activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales, son particularmente ventajosos para una terapia tumoral antivascular. El pequeño tamaño del polipéptido que permite la unión a las células endoteliales de los vasos tumorales mejora la orientación de la proteína de fusión hacia la membrana fosfolipídica de la célula endotelial. La formación del complejo enzima/sustrato esencial para la coagulación sanguínea no está impedido estéricamente y el factor tisular TF, que puede activar la coagulación, no está sometido a ningún cambio de conformación.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido capaz de activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales es el factor tisular TF con la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO: 1 (figura 12). La invención comprende además secuencias de factor tisular con una homología de aminoácidos, por lo menos, del 70% o, por lo menos, del 80%, con respecto a la SEC ID NO: 1 (figura 12), siendo particularmente preferentes las secuencias que presentan una homología, por lo menos, del 95%. El grado de homología se determina escribiendo las dos secuencias una encima de la otra, siendo posibles cuatro huecos en una longitud de 100 aminoácidos, a fin de alcanzar la máxima coincidencia posible entre las secuencias comparadas (véase Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5,

124, 1972). A continuación, se determina el porcentaje de residuos aminoácidos de la más corta de las dos cadenas de aminoácidos que se encuentra frente a residuos de aminoácidos idénticos de la otra cadena.

5 El péptido capaz de activar la coagulación sanguínea en los vasos tumorales cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales puede ser, además, un fragmento del factor tisular TF o un fragmento de una secuencia homóloga al TF. Preferentemente, el fragmento tiene la secuencia indicada en SEC ID NO: 2 (figura 13). La secuencia (tTF₁₋₂₁₈ o, de forma abreviada, tTF) indicada en SEC ID NO: 2 (figura 13) comprende los 218 aminoácidos aminoterminales del TF. Además, según la presente invención, también es posible utilizar fragmentos de tTF que carecen de varios aminoácidos en los extremos N o C con respecto al tTF. Por ejemplo, es posible utilizar fragmentos que carecen de hasta 10 aminoácidos en el extremo N (tTF₁₁₋₂₁₈). Además, se pueden utilizar fragmentos que carecen de hasta 8 aminoácidos en el extremo C (tTF₁₋₂₁₀), por ejemplo (tTF₁₋₂₁₄).

15 La presente invención se refiere a polipéptidos de fusión en los que el péptido capaz de unirse selectivamente a las células endoteliales de los vasos tumorales está unido al extremo C del péptido capaz de activar la coagulación sanguínea. Según la presente invención, el término "células endoteliales de los vasos tumorales" y el término "células endoteliales presentes en los vasos tumorales" se utilizan para designar las células que recubren los vasos sanguíneos de un tumor. La presente invención ha establecido que la disposición anterior garantiza la orientación de la proteína de fusión perpendicularmente a la membrana fosfolipídica de la célula endotelial, lo que resulta particularmente ventajoso para activar la coagulación sanguínea. Esta orientación corresponde a la orientación natural del TF durante la inducción de la coagulación sanguínea. Tal como se muestra en la figura 3, se encuentran cinéticas de Michaelis-Menten muy similares con respecto a la activación del factor X por las proteínas de fusión FVIIa/tTF₁₋₂₁₈ o FVIIa/tTF₁₋₂₁₈ para todos los constructos producidos de este modo. En la técnica anterior, en cambio, el péptido que activa la coagulación estaba unido al extremo C de la molécula diana (véase (16)). De este modo, los polipéptidos de fusión según la presente invención difieren fundamentalmente de los péptidos utilizados en la técnica anterior.

25 El péptido capaz de unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales puede ser cualquier péptido con una longitud de entre 3 y 30 aminoácidos y que se una a las células endoteliales de los vasos tumorales con una especificidad elevada. Los péptidos correspondientes se pueden aislar a partir de bibliotecas de péptidos por métodos habituales en el estado de la técnica. Pueden presentar una estructura lineal o cíclica, en función de la biblioteca de péptidos que se elija.

35 Según una forma de realización de la presente invención, los péptidos que permiten la unión selectiva del polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales comprenden la secuencia de aminoácidos RGD o NGR. Ambas secuencias se conocen en la técnica anterior por su unión específica a las integrinas, especialmente las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (péptidos RGD), y como motivos de adhesión celular (péptidos NGR) (véase (8)). Según la presente invención, se ha puesto de manifiesto sorprendentemente que estos péptidos son especialmente adecuados para formar parte de un polipéptido de fusión, la otra parte del cual es un péptido capaz de activar la coagulación sanguínea en tumores cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales.

40 Se han obtenido efectos particularmente ventajosos con los péptidos lineales que presentan las secuencias GRGDSP, GNGRAHA y GALNGRSHAG, y los péptidos cíclicos con las secuencias GCNGRCG, GCNGRCVSGCAGRC y GCVLNGRMEC. Se ha puesto de manifiesto que los polipéptidos de fusión que comprenden estas secuencias y la secuencia de los primeros 218 aminoácidos del TF humano son muy adecuados para la terapia tumoral antivascolar. Particularmente, se puso de manifiesto que estos polipéptidos de fusión producen una inhibición significativa del crecimiento tumoral o reducen el tamaño de los tumores (véase las figuras 7 y 8). La inducción de remisión tumoral parcial observada (véase la figura 8) parece anunciar resultados positivos en la terapia tumoral en humanos sobre la base del elevado poder predictivo del modelo de ratón (42, 43, 44).

50 La presente invención comprende además proteínas de fusión con péptidos RGD cíclicos, ya que la ciclación mejora la afinidad por las integrinas (tal como se describe, por ejemplo, en la referencia 21).

55 La presente invención se refiere además a polipéptidos de fusión que presentan una de las secuencias indicadas en SEC ID NO: 3-8 (figuras 14-19).

60 Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión, tal como se ha descrito anteriormente. Los correspondientes ácidos nucleicos pueden tener, por ejemplo, una de las secuencias indicadas en SEC ID NO: 10-15 (figuras 21-26).

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a vectores que comprenden uno de los ácidos nucleicos mencionados anteriormente. Generalmente, los vectores correspondientes también comprenden secuencias reguladoras para la expresión del ácido nucleico. Dichos vectores están ampliamente descritos en la técnica anterior y están disponibles comercialmente a través de un gran número de empresas.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a células que comprenden uno de los ácidos nucleicos o vectores mencionados anteriormente. Generalmente, las células se utilizan para la expresión del ácido nucleico y la producción recombinante de los polipéptidos de fusión según la presente invención. Existe un gran número de células que pueden utilizarse con este propósito, incluidas *E. coli*, células de levadura y líneas celulares animales, tales como las células CHO o COS. Las células apropiadas y sus aplicaciones están ampliamente descritas en la técnica anterior.

Los polipéptidos de la presente invención según la reivindicación 1 se pueden preparar además por otros métodos adecuados, por ejemplo, por acoplamiento químico de péptidos individuales. Así, los péptidos individuales se pueden producir por métodos convencionales en el estado de la técnica, por ejemplo, por síntesis química o mediante expresión heteróloga, y a continuación unirse entre sí por acoplamiento.

Finalmente, la presente invención también se refiere a medicamentos que comprenden los polipéptidos de fusión, ácidos nucleicos, vectores o células descritos anteriormente. Los medicamentos pueden comprender además vehículos, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Además, los polipéptidos presentes en dicho medicamento pueden presentarse en un estado modificado, por ejemplo, pegilados, es decir, acoplados a una molécula de polietilenglicol.

Los polipéptidos de fusión según la presente invención o los medicamentos que los contienen se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y, particularmente, para la terapia tumoral antivascolar. Entre las enfermedades neoplásicas que se pueden tener en cuenta para el tratamiento con ayuda de los polipéptidos de fusión según la presente invención o los medicamentos que los contienen se incluyen, por ejemplo, carcinomas bronquiales y otros tumores del tórax y el mediastino, cánceres de mama y otros tumores ginecológicos, carcinomas colorrectales, carcinomas pancreáticos y otros tumores del tubo gastrointestinal, melanomas malignos y otros tumores de la piel, tumores en la región de la cabeza y el cuello, carcinomas prostáticos y otros tumores urogenitales, sarcomas, tumores endocrinos activos, leucemias y síndromes mielodisplásicos, y linfomas hodgkinianos y no hodgkinianos.

Además, también se pueden tratar tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, y la neovascularización en la retinopatía diabética.

Aparte de la administración intravenosa, también es posible la administración subcutánea e intraperitoneal de los polipéptidos de fusión o medicamentos. Mediante el empaquetamiento en vehículos farmacéuticos, que impiden la escisión de los polipéptidos de fusión en el tubo gastrointestinal, los polipéptidos de fusión o medicamentos se pueden administrar también por vía oral.

Además, puede resultar ventajoso combinar la administración de polipéptidos de fusión según la invención con otros enfoques terapéuticos, por ejemplo, quimioterapia citotóxica o irradiación. También es posible la combinación con otras sustancias activas, por ejemplo con factor VIIa o doxiciclina, pero preferentemente la combinación del polipéptido según la invención con factor VIIa o doxiciclina no es necesaria.

La presente invención se describe con más detalle a través de los siguientes ejemplos:

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión y purificación de tTF y proteínas de fusión de tTF

Se sintetizó el ADNc que codifica los 218 aminoácidos aminoterminales del factor tisular TF (en lo sucesivo, designado tTF) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el cebador que se indica en SEC ID NO: 16 y SEC ID NO: 17 (figura 27), y se clonó en el lector de expresión pET-30a(+) (Novagen). Los plásmidos recombinantes se transformaron en *E. coli* (BL21), se expresaron y se purificaron (kit Qiagen Plasmid).

Junto con el factor tisular truncado tTF, se construyeron proteínas de fusión de péptidos de tTF, uniéndose en primer lugar los péptidos diana al extremo carboxilo del factor tisular tTF soluble. Se construyeron las siguientes proteínas de fusión lineales:

tTF-GRGDSP (SEC ID NO: 3; figura 14; en adelante, designado tTF-RGD; se utilizaron los cebadores PCR con SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19 (figura 28));

tTF-GNGRAHA (SEC ID NO: 4; figura 15; en adelante, designado tTF-NGR; se utilizaron los cebadores PCR con SEC ID NO: 20 y SEC ID NO: 21 (figura 29));

tTF-GALNGRSHAG (SEC ID NO: 5; figura 16; se utilizaron los cebadores PCR con SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 29 (figura 33));

Además, se sintetizaron las siguientes proteínas de fusión cíclicas:

tTF-GCNGRCG (SEC ID NO: 6; figura 17; en adelante, designado tTF-cycloNGR1; se utilizaron los cebadores PCR con SEC ID NO: 22 y SEC ID NO: 23 (figura 30));

5 tTF-GCNGRCSVSGCAGRC (SEC ID NO: 7; figura 18; en adelante, designado tTF-cycloNGR2; se utilizaron los cebadores PCR con SEC ID NO: 24 y SEC ID NO: 25 (figura 31));

tTF-GCVLNGRMEC (SEC ID NO: 8; figura 19; en adelante, designado tTF-cycloNGR3; se utilizaron los cebadores PCR con SEC ID NO: 26 y SEC ID NO: 27 (figura 32))

10 Todos los constructos (incluido el tTF) se expresaron en el vector pET30a(+), que media la expresión adicional de una etiqueta de afinidad aminoterminal de 6 residuos de histidina y unos cuantos aminoácidos codificados por vectores. Con la ayuda de dicha etiqueta de afinidad, los constructos se pudieron purificar por cromatografía de afinidad en una columna de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA, Novagen). La etiqueta de afinidad se muestra en SEC ID NO: 30. SEC ID NO: 31 y SEC ID NO: 32 indican, a modo de ejemplo, las secuencias de aminoácidos completas de tTF-GRGDSP y tTF-GNGRAHA con etiqueta de afinidad.

15 Los constructos se seleccionaron de modo que, a partir de la estructura cristalina de rayos X conocida para el complejo tTF:FVIIa (19), se garantiza la orientación vertical de la proteína de fusión de tTF con respecto a la membrana fosfolipídica de las células endoteliales, lo que corresponde a la orientación del TF nativo. Se tuvo en cuenta, además, que la estructura seleccionada no debía dar lugar a que el tTF provocara ningún impedimento estérico a la interacción con el FVIIa y el sustrato macromolecular FX. Debido a la especificidad de la secuencia RGD por la integrina $\alpha_v\beta_3$ y de la secuencia NGR por la CD13 (aminopeptidasa N), se obtiene selectividad del tumor, ya que estos receptores se expresan de forma selectiva y específica a densidad elevada en las células endoteliales del tumor, pero, salvo en algunas excepciones, no en las restantes células endoteliales del tejido normal (véase figura 1).

20 El tTF y las proteínas de fusión descritas tTF-RGD, tTF-NGR, tTF-GALNGRSHAG y tTF-cycloNGR1-3, se transformaron y expresaron en *E. coli* (BL21) por medio de pET30a(+). Se centrifugaron células de *E. coli* BL21 DE3 transformadas e inducidas por IPTG y se absorbieron en 5-7 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1 mM; 10 µg/ml de aprotinina; 2 mg/ml de lisozima)/g de sedimento y se añadieron 20 µl de benzonasa (Novagen). Tras 90 minutos de incubación a temperatura ambiente (RT) y centrifugación a 12.000 g, 20 min, 4°C, el sedimento se resuspendió y se homogeneizó por tratamiento con ultrasonidos en tampón de lavado (Tris/HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM; 3% de Triton X-100). Los cuerpos de inclusión se disolvieron durante la noche a temperatura ambiente en 2-4 ml/g de sedimento en tampón de desnaturalización (cloruro de guanidinio 6 M, NaCl 0,5 M, NaH₂PO₄ 20 mM, DTT 1 mM). El sobrenadante de la centrifugación (5.000 g, 30 min, 4°C) se filtró con un filtro de 0,22 µg. Los constructos se purificaron hasta homogeneidad en una columna de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA, Novagen) a través de las secuencias His-Tag adicionalmente introducidas del constructo. La purificación y el plegamiento de las proteínas se llevaron a cabo con el kit His Bind Buffer (Novagen). A continuación se llevó a cabo una diálisis frente a tampón TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

25 La identidad de las proteínas se confirmó por SDS-PAGE, transferencia Western y espectroscopía de masas (véase figura 2).

45 **Ejemplo 2: Caracterización funcional de tTF y proteínas de fusión de tTF**

La actividad funcional de estas proteínas de fusión con respecto a la actividad del cofactor en la activación del factor X a factor Xa a través del factor VIIa se puso de manifiesto *in vitro* por análisis de Michaelis-Menten. La capacidad del tTF y de los polipéptidos de fusión de tTF para intensificar la activación proteolítica específica de FX a través de FVIIa en presencia de fosfolípidos se determinó mediante una versión ligeramente modificada del método descrito por Ruf (45). Para ello, se pipetearon 20 µl de cada uno de los siguientes reactivos en placas de microtitulación: (a) FVIIa recombinante 50 nM (Novo-Nordisk) en TBS-BSA; (b) tTF/polipéptido de fusión de tTF 0,16 nM - 1,6 µM en TBS-BSA; (c) CaCl₂ 25 mM y vesículas fosfolipídicas 500 µM (fosfatidilcolina/fosfatidilserina, 70/30, M/M; Sigma). Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 20 µl del sustrato natural FX (Enzyme Research Laboratories) a una concentración de 5 µM. A continuación, se tomaron muestras con pipeta a intervalos de un minuto y la reacción se detuvo mediante la adición de una solución de EDTA 100 mM. La cantidad de FXa que se formó se midió por adición del sustrato cromógeno Spectrozyme FXa en un lector de microplacas mediante la determinación del cambio de absorción a 405 nm y los parámetros de la cinética de Michaelis-Menten se analizaron por el método descrito por Ruf. Los resultados ponen de manifiesto que el tTF y los polipéptidos de fusión de tTF son funcionalmente activos en estas condiciones (figura 3). Las constantes de Michaelis (Km) obtenidas para los polipéptidos de fusión estaban comprendidas dentro del intervalo 0,12-1,2 nM (figura 3), y por lo tanto en el rango inferior publicado para el tTF. Por lo tanto, se puede suponer que la actividad funcional no se ve afectada por la fusión del tTF con los péptidos.

Ejemplo 3: Unión de las proteínas de fusión de tTF a $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* e *in vivo*

Se puso de manifiesto la unión de tTF-RGD y tTF-NGR a la integrina $\alpha_v\beta_3$ en un ensayo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) mediante la inmovilización de $\alpha_v\beta_3$ purificada sobre placas de microtitulación (véase la figura 4). La especificidad de la unión de tTF-RGD a $\alpha_v\beta_3$ se vio enfatizada por el hecho de que el péptido sintético con la secuencia GRGDSP (de la empresa Gibco) inhibe de forma competitiva la unión de tTF-RGD a $\alpha_v\beta_3$ en este sistema de ensayo (véase la figura 5).

A continuación, se evaluó la unión específica de tTF-RGD a $\alpha_v\beta_3$ en las células endoteliales. Para ello, se analizó la unión diferencial de tTF biotinilado y tTF-RGD a las células endoteliales en suspensión mediante FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). El hecho de que todas las células endoteliales que se mantienen en el cultivo de tejido se activan, es decir, expresan moléculas de $\alpha_v\beta_3$, se utiliza experimentalmente. Esto se puede detectar mediante diversos métodos inmunohistoquímicos. Así, una célula endotelial cultivada corresponde, en relación con su patrón de expresión con respecto a $\alpha_v\beta_3$, a una célula endotelial del tumor. Correspondientemente, una célula endotelial cultivada se puede utilizar como sistema modelo para la unión específica de sustancias a células endoteliales del tumor y también permite realizar predicciones acerca de la toxicidad esperada.

Se utilizó estreptavidina-ficoeritrina como método de detección. La intensidad de fluorescencia medida para tTF-RGD fue 8 veces mayor que para el tTF (figura 6A). Además, la unión de tTF-RGD 0,1 μM a las células endoteliales se redujo de forma competitiva en un 75% mediante la administración de una concentración 1 μM del péptido sintético GRGDSP (figura 6B). Esto subraya la especificidad de la unión de tTF-RGD a los receptores de unión de RGD de la superficie de las células endoteliales, tales como la $\alpha_v\beta_3$.

Ejemplo 4: Efectos antitumorales de las proteínas de fusión de tTF en un modelo animal

Se evaluaron en las proteínas de fusión de tTF-RGD y NGR-tTF los efectos y efectos secundarios sobre heterotrasplantes de tumores humanos en ratones lampiños atómicos. Para ello, se utilizaron los modelos establecidos en nuestro laboratorio (33, 34). Se inyectaron las líneas celulares CCL185 (adenocarcinoma pulmonar humano) y M-21 (melanoma humano) por vía subcutánea en el flanco de ratones lampiños macho BALB/c (9-12 semanas de edad). Al alcanzar un volumen tumoral de aproximadamente 50-100 mm^3 (CCL185) o de 400-600 mm^3 (M-21), los ratones se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos. El grupo 1 recibió únicamente solución salina fisiológica (NaCl), el grupo 2, tTF, el grupo 3, tTF-RGD, y el grupo 4, tTF-NGR (en cada caso, 1,5-2,0 mg de la proteína/kg de peso corporal). Las inyecciones se realizaron en la vena caudal de los animales a intervalos de 1-3 días (dependiendo de la tasa de crecimiento de la línea celular en concreto). Se observó una actividad terapéutica considerable de las proteínas de fusión. Los tumores de los ratones tratados con las proteínas de fusión de tTF-RGD o tTF-NGR vieron significativamente inhibido su crecimiento o se redujo su tamaño hasta la remisión parcial en comparación con la administración de tTF o NaCl (véase las figuras 7 y 8).

A fin de verificar el mecanismo de acción de la inducción de trombosis en los vasos tumorales, se llevó a cabo el siguiente experimento: se inyectó la línea celular de melanoma humano en el flanco de dos ratones lampiños macho BALB/c. Al alcanzarse un tamaño del tumor de aproximadamente 500 mm^3 , se inyectaron 2,0 mg/kg de peso corporal de tTF-NGR o NaCl en la vena caudal. La figura 9A muestra una fotografía macroscópica *in vivo* del ratón portador de tumor 20 min después de la inyección de la proteína de fusión tTF-NGR (mitad izquierda de la imagen) o de NaCl (mitad derecha de la imagen). La imagen macroscópica con coloración azulada pálida del tumor tras la inyección de tTF-NGR indica necrosis tumoral. Tras 60 min, los ratones se desangraron, se les extirpó el tumor en su totalidad y éste se sometió a un examen histológico. La figura 9B muestra la imbibición hemorrágica del tumor tratado con tTF-NGR como un signo de hemorragia secundaria como resultado de una necrosis tumoral incipiente. En cambio, el tumor tratado con NaCl aparece vital (figura 9C).

El análisis histológico del melanoma muestra la formación microscópicamente visible de trombos en los vasos sanguíneos (figuras 10A-D). Este descubrimiento demuestra el mecanismo propuesto para los efectos antitumorales de tTF-NGR, es decir, la inducción de trombos en los vasos sanguíneos. La elevada selectividad de tTF-NGR por los vasos sanguíneos tumorales se demuestra por la ausencia de detección histológica de coagulación y necrosis en el tejido normal, tal como de corazón, riñón, hígado y pulmón (figuras 11A-D). Ni siquiera la administración de dosis elevadas repetidas de tTF-NGR (4 mg/kg de peso corporal) dio lugar a la formación visible de coágulos ni a toxicidad para los órganos.

Ejemplo 5: Efectos antitumorales de las proteínas de fusión de tTF en el modelo tumoral animal HT1080

Se investigó también la actividad antitumoral de la proteína de fusión tTF-RGD en ratones lampiños BALB/c con fibrosarcomas (HT1080). Estos tumores presentan un crecimiento rápido y una buena vascularización. En la tabla 2 y en la figura 34 se presentan los resultados de dos experimentos. Tras la segunda inyección de tTF-RGD, se observó una inhibición significativa del crecimiento de los tumores HT1080 en comparación con los grupos de control. Este efecto duró hasta el final del experimento, en el día 7 ($P = 0,021$ para tTF-RGD con respecto al control con tampón (solución salina fisiológica), $P = 0,005$ para tTF-RGD con respecto a tTF). Como en los experimentos anteriores, en este modelo se observó una regresión parcial del volumen tumoral.

Tabla 1:

Efecto de tTF-RGD sobre el crecimiento de tumores M21 en ratones

5

| Tratamiento | Volumen tumoral medio (mm ³) | | P con respecto al tampón | P con respecto a tTF | n |
|-------------|--|-----------|--------------------------|----------------------|----|
| | Día 0 | Día 7 | | | |
| Tampón | 590 ± 77 | 994 ± 140 | | ns | 9 |
| tTF | 558 ± 47 | 931 ± 147 | ns | | 11 |
| tTF-RGD | 585 ± 85 | 514 ± 81 | < 0.01 | < 0.05 | 7 |

ns: no significativo

Tabla 2:

Efecto de tTF-RGD sobre el crecimiento de los tumores HT1080 en ratones

10

| Tratamiento | Volumen tumoral medio (mm ³) | | P con respecto al tampón | P con respecto a tTF | n |
|-------------|--|------------|--------------------------|----------------------|----|
| | Día 0 | Día 7 | | | |
| Tampón | 1671 ± 296 | 2431 ± 559 | | ns | 15 |
| tTF | 1751 ± 269 | 2335 ± 398 | ns | | 14 |
| tTF-RGD | 1725 ± 197 | 1241 ± 122 | < 0.05 | < 0.01 | 12 |

ns: no significativo

Tabla 3:

Efecto de tTF-RGD sobre el crecimiento de los tumores CCL185 en ratones

15

| Tratamiento | Volumen tumoral medio (mm ³) | | P con respecto al tampón | P con respecto a tTF | n |
|-------------|--|-----------|--------------------------|----------------------|----|
| | Día 0 | Día 7 | | | |
| Tampón | 39 ± 3 | 467 ± 137 | | ns | 9 |
| tTF | 44 ± 8 | 764 ± 148 | ns | | 5 |
| tTF-RGD | 45 ± 5 | 130 ± 19 | < 0.01 | < 0.01 | 10 |

ns: no significativo

El experto en la materia puede construir sin mayores problemas otras proteínas de fusión de tTF a partir de la descripción de la presente invención. Los candidatos potenciales son los péptidos TAASGVRSMH y LTLRWVGLMS, que se unen a NG 2, el homólogo murino del proteoglicano de melanoma humano (12). La expresión de NG 2 está restringida a las células tumorales y los vasos angiogénicos de un tumor (35). Otro candidato es el péptido sintético TTHWGFTL, que produce una inhibición selectiva y potente de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) (13). Como la integrina $\alpha_v\beta_3$ también se une de forma evidente a la MMP-2 de modo independiente del RGD, esto significa que la enzima activa está localizada en la superficie de los vasos sanguíneos angiogénicos (36). Un constructo constituido por tTF y dicho péptido inhibidor de MMP-2 puede mediar de modo parecido en la unión selectiva de tTF₁₋₂₁₈ a la membrana de las células endoteliales de los vasos tumorales.

Referencias

1. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989
2. Dvorak HJ, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ: Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors - Concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 174: 1275-1278, 1991
3. Dvorak HJ, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039, 1995
4. Terman BJ, Dougher-Vermazen M: Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metastasis Rev* 15: 159-163, 1996
5. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdzar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE: Upregulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: Implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1: 1623-1634, 1995

6. Rettig WJ, Garinchesa P, Healey JH, Su SL, Jaffe EA, Old LJ: Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10832-10836, 1992
- 5 7. Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotrota MR, Bigotti A, Natali PG: A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 108: 1139-1148, 1989
8. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E: Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377-380, 1998
- 10 9. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Peruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M: Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13612-13617, 1997
- 15 10. Olson TA, Mohanraj D, Roy S, Ramakrishnan S: Targeting the tumor vasculature: inhibition of tumor growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int J Cancer* 73: 865-870, 1997
11. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH: CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97: 652-659, 2001
- 20 12. Burg MA, Pasqualini R, Arap W, Ruoslahti E, Stallcup WB: NG2 Proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 59: 2869-2874, 1999
- 25 13. Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkila P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R: Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol* 17: 768-774, 1999
14. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, Thorpe PE: Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 275: 547-550, 1997
- 30 15. Ran S, Gao B, Duffy S, Watkins L, Rote N, Thorpe PE: Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Cancer Res* 58: 4646-4653, 1998
- 35 16. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D: Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res* 61: 711-716, 2001
17. Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El-Sheikh A, Vessella R, Edgington TS. Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 62: 5470-5475, 2002
- 40 18. Gottstein C, Wels W, Ober B, Thorpe PE: Generation and characterisation of recombinant vascular targeting agents from hybridoma cell lines. *BioTechniques* 30: 190-200, 2001
19. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC: Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81: 734-744, 1993
- 45 20. Banner DW, D'Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380: 41-46, 1996
21. Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E: Selection of peptides binding to the $\alpha 5\beta 1$ integrin from phage display library. *J Biol Chem* 268: 20205-20210, 1993
- 50 22. Healy JM, Murayama O, Maeda T, Yoshino K, Sekiguchi K, Kikuchi M: Peptide ligands for integrin $\alpha v\beta 3$ selected from random phage display libraries. *Biochemistry* 34: 3948-3955, 1995
- 55 23. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60: 722-727, 2000
24. Curnis F, Sacchi A, Borgna L, Magni F, Gasparri A, Corti A: Enhancement of tumor necrosis factor α antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD 13). *Nature Biotechnology* 18: 1185-1190, 2000
- 60 25. Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, Del Rio G, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE, Pasqualini R: Anti-cancer activity of targeted proapoptotic peptides. *Nature Med* 5: 1032-1038, 1999
- 65 26. Ruoslahti E: Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Cancer Biol* 10:435-442,2000

27. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruohshti E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60: 722-727, 2000
- 5 28. Curnis F, Arrighi G, Sacchi A, Fischetti L, Arap W, Pasqualini R, Corti A. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res* 62: 867-874, 2002
- 10 29. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M: Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13612-13617, 1997
- 15 30. Yun Z, Menter DG, Nicolson GL: Involvement of integrin $\alpha \beta 3$ in cell adhesion, motility and liver metastasis of murine RAW117 large cell lymphoma. *Cancer Res* 56: 3103-3111, 1996
31. Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA: Requirement of vascular integrin $\alpha \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264: 569-571, 1994
- 20 32. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA: Integrin $\alpha \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 92: 391-400, 1998
33. Topp MS, Koenigsmann M, Mire-Sluis A, Oberberg D, Eitelbach F, von Marschall Z, Notter M, Reufi B, Stein H, Thiel E, Berdel WE: Recombinant human interleukin-4 inhibits growth of some human lung tumor cell lines in vitro and in vivo. *Blood* 82: 2837-2844, 1993
- 25 34. Topp MS, Papadimitriou CA, Eitelbach F, Koenigsmann M, Oelmann E, Koehler B, Oberberg D, Reufi B, Stein H, Thiel E, Berdel WE: Recombinant human interleukin 4 has antiproliferative activity on human tumor cell lines derived from epithelial and non-epithelial histologies. *Cancer Res* 55: 2173-2176, 1995
- 30 35. Schrappe M, Klier FG, Spiro RC, Gladson CL: Correlation of chondroitin sulfate proteoglycan expression on proliferating brain capillary endothelial cells with the malignant phenotype of astroglial cells. *Cancer Res* 51: 4986-4993, 1991
- 35 36. Brooks PC: Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha \beta 3$. *Cell* 85: 683-693, 1996
37. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA: Disruption of Angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92: 391-400, 1998
- 40 38. Schnurch H, Risau W: Expression of tie2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinase in the endothelial cell lineage. *Development* 119: 957-968, 1993
- 45 39. Peters KG, Coogan A, Berry D, Marks J, Iglehart JD, Kontos CD, Rao P, Sankar S, Trogan E: Expression of tie2/tek in breast tumor vasculature provides a new marker for evaluation of tumor angiogenesis. *Br J Cancer* 77: 51-56, 1998
40. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180, 1996
- 50 41. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TH, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60, 1997
- 55 42. Scholz CC, Berger DP, Winterhalter BR, Henß H, Fiebig HH: Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumour xenografts. *Eur J Cancer* 26: 901-905, 1990
43. Fiebig HH, Berger DP, Dengler WA, Wallbrecher E, Winterhalter BR: Combined in vitro/in vivo test procedure with human tumor xenografts for new drug development. *Contrib. Oncol. Basel, Karger* 42: 321-351, 1992.
- 60 44. Fiebig HH, Burger AM: Human tumor xenografts and explants. *Tumor Models in Cancer Research*, eds B.A. Teicher, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002.
45. Ruf W, Rehemtulla A, Edgington TS: Phospholipid-independent and -dependent Interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* 266: 2158-2166, 1991.
- 65

46. Hu P, Yan J, Sharifi J, Bai T, Khawla LA, Epstein AL: Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis. Cancer Research 63: 5046-5053.

5 47. Rippmann JF, Pfizenmaier K, Mattes R, Rettig WJ, Moosmayer D: Fusion of the tissue factor extracellular domain to a tumour stroma specific single-chain fragment variable antibody results in an antigen-specific coagulation-promoting molecule. Biochem J. (2000) 349, 805-812.

Listado de secuencias

10 <110> Medizinische Klinik und Poliklinik A des Universitätsklinikums Münster

<120> Polipéptidos de fusión para la terapia tumoral antivascolar

15 <130> P 51875

<160> 31

<170> Patente en versión 3.1

20 <210> 1

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> Secuencia de amino ácido de TF humano

<400> 1

```

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1                    5                      10                      15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
                20                    25                      30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
                35                    40                      45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50                    55                      60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65                    70                      75                      80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
                85                    90                      95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
                100                   105                      110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
                115                   120                      125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130                   135                      140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145                   150                      155                      160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
                165                   170                      175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
                180                   185                      190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

```

ES 2 397 922 T3

195 200 205
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
 210 215 220
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
 225 230 235 240
 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
 245 250 255
 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
 260

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

<220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF₁₋₂₁₈

10 <400> 2

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

195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg
 210 215

15 <210> 3
 <211> 224

ES 2 397 922 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GRGDSP

<400> 3

```

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
1          5          10          15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
          20          25          30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
          35          40          45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
50          55          60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65          70          75          80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
          85          90          95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
          100          105          110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
          115          120          125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130          135          140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145          150          155          160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
          165          170          175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
          180          185          190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
          195          200          205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Arg Gly Asp Ser Asp
210          215          220
  
```

10 <210> 4
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GNGRAHA

<400> 4

ES 2 397 922 T3

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

Ala
225

<210> 5
<211> 228
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GALNGRSHAG

<400> 5

ES 2 397 922 T3

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

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GCNGRCG

10

<400> 6

ES 2 397 922 T3

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

<210> 7
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GCNGRCVSGCAGRC

10

<400> 7

ES 2 397 922 T3

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

5 <210> 8
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GCVLNGRMEC

<400> 8

ES 2 397 922 T3

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

- 5 <210> 9
- <211> 654
- <212> ADN
- <213> Artifical

- 10 <220>
- <221> Secuencia de nucleótido de tTF₁₋₂₁₈

<400> 9

ES 2 397 922 T3

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatthttgg agtgggaacc caaaccgctc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg ggcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactttag tcagaaggaa caacactttc 420
 ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct 480
 tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgattc cctcccgaac agttaaccgg 600
 aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt caga 654

<210> 10
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Secuencia de nucleótido de tTF-GRGDSP

10

<400> 10

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatthttgg agtgggaacc caaaccgctc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg ggcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactttag tcagaaggaa caacactttc 420
 ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct 480
 tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgattc cctcccgaac agttaaccgg 600
 aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggaaga 660

ggtgattctc ca 672

15

<210> 11
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <221> Secuencia de nucleótido de tTF-GNGRAHA

<400> 11

ES 2 397 922 T3

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatthttgg agtgggaacc caaacccgtc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaagaa caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagtcc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagtthttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactthtag tcagaaggaa caacactthc 420
 ctaagcctcc gggatgthtt tggcaaggac ttaatthata cactthatta ttggaatct 480
 tcaagthcag gaaagaaaac agccaaaaca aactactatg agththttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgtht cagtgtthca gcagtgattc cctcccgaac agthaacgg 600
 aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggtaac 660
 ggaagagcac atgca 675

5 <210> 12
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Secuencia de nucleótido de tTF-GALNGRSHAG

<400> 12

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatthttgg agtgggaacc caaacccgtc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaagaa caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagtcc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagtthttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactthtag tcagaaggaa caacactthc 420
 ctaagcctcc gggatgthtt tggcaaggac ttaatthata cactthatta ttggaatct 480
 tcaagthcag gaaagaaaac agccaaaaca aactactatg agththttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgtht cagtgtthca gcagtgattc cctcccgaac agthaacgg 600
 aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggtgct 660
 ttaaatggaa gatctcaogc tggg 684

20 <210> 13
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <221> Secuencia de nucleótido de tTF-GCNGRCG

<400> 13

ES 2 397 922 T3

tcaggcacta caaataactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatthttgg agtgggaacc caaaccogtc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccoggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagtthttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactthtag tcagaaggaa caaactthtc 420
 ctaagcctcc gggatgthtt tggcaaggac ttaattthata cactthatta ttggaaatct 480
 tcaagthtcag gaaagaaaac agccaaaaca aactactaatg agththttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgthtt cagtgtthcaa gcagtgattc cctcccgaac agthtaaccgg 600
 aagagtacag acagccoggt agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggtctg 660
 aacggtagat gtggt 675

5 <210> 14
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Secuencia de nucleótido de tTF-GCNGRCVSGCAGRC

<400> 14

15 tcaggcacta caaataactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatthttgg agtgggaacc caaaccogtc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccoggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagtthttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactthtag tcagaaggaa caaactthtc 420
 ctaagcctcc gggatgthtt tggcaaggac ttaattthata cactthatta ttggaaatct 480
 tcaagthtcag gaaagaaaac agccaaaaca aactactaatg agththttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgthtt cagtgtthcaa gcagtgattc cctcccgaac agthtaaccgg 600
 aagagtacag acagccoggt agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggttgt 660
 aatggaagat gtgthttctgg atgtgcagga cgatgt 696

20 <210> 15
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <221> Secuencia de nucleótido de tTF-GCVLNGRMEC

<400> 15

ES 2 397 922 T3

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaattttgg agtgggaacc caaacccgtc aatcaagtct acactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctcttctc ctaccoggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg ggcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acagtgggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactttag tcagaaggaa caacactttc 420
 ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct 480
 tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgatc cctcccgaac agttaaccgg 600
 aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggatgc 660
 gtcttaaatg gtaggatgga atgc 684

5 <210> 16
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción de tTF₁₋₂₁₈

<400> 16
 catgccatgg gatcaggcac tacaatact gtggcagcat ataat 45

15 <210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción de tTF₁₋₂₁₈

<400> 17
 cgggatccta ttatctgaat tccccttct cctggcccat 40

25 <210> 18
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción de tTF-GRGDSP

<400> 18
 catgccatgg gatcaggcac tacaatact gtggcagcat ataat 45

40 <210> 19
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción de tTF-GRGDSP

ES 2 397 922 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 19 cgggatccta ttatggagaa tcacctctc ctctgaattc ccc | 43 |
| 5 | <210> 20 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial | |
| 10 | <220> <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción de tTF-GNGRAHA | |
| | <400> 20 catgccatgg gatcaggcac tacaataact gtggcagcat ataataat | 45 |
| 15 | <210> 21 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial | |
| 20 | <220> <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción de tTF-GNGRAHA | |
| 25 | <400> 21 cgggatccta ttatgcatgt gctctccgt tacctctgaa ttcccc | 46 |
| 30 | <210> 22 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción de tTF-GCNGRCG | |
| 35 | <400> 22 catgccatgg gatcaggcac tacaataact gtggcagcat ataataat | 45 |
| 40 | <210> 23 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción de tTF-GCNGRCG | |
| 45 | <400> 23 cgggatccta ttaaccacat ctaccgttgc agcctctgaa ttcccc | 46 |
| 50 | <210> 24 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción tTF-GCNGRCVSGCAGRC | |
| 55 | <400> 24 catgccatgg gatcaggcac tacaataact gtggcagcat ataataat | 45 |
| 60 | <210> 25 <211> 67 <212> ADN <213> Artificial | |
| 65 | <220> <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción tTF-GCNGRCVSGCAGRC | |

ES 2 397 922 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 25 | |
| | cgggatccta ttaacatcgt cctgcacatc cagaaacaca tcttcatta caacctctga | 60 |
| 5 | attcccc | 67 |
| | <210> 26 | |
| | <211> 45 | |
| | <212> ADN | |
| 10 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción de tTF-GCVLNGRMEC | |
| 15 | <400> 26 | |
| | catgccatgg gatcaggcac tacaatact gtggcagcat ataat | 45 |
| | <210> 27 | |
| | <211> 55 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción de tTF-GCVLNGRMEC | |
| 25 | <400> 27 | |
| | cgggatccta ttagcattcc atcctacat ttaagacgca tcctctgaat tcccc | 55 |
| | <210> 28 | |
| | <211> 45 | |
| 30 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <221> Cebador 5' oligonucleótido para la producción tTF-GALNGRSHAG | |
| | <400> 28 | |
| | catgccatgg gatcaggcac tacaatact gtggcagcat ataat | 45 |
| 40 | <210> 29 | |
| | <211> 55 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <221> Cebador 3' oligonucleótido para la producción tTF-GALNGRSHAG | |
| | <400> 29 | |
| 50 | cgggatccta ttaaccagcg tgagatcttc catttaaagc acctctgaat tcccc | 55 |
| | <210> 30 | |
| | <211> 45 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <221> Secuencia de aminoácido de etiqueta de afinidad | |
| | <400> 30 | |

ES 2 397 922 T3

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 20 25 30
 Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met Gly
 35 40 45

5 <210> 31
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GRGDSP con etiqueta de afinidad aminoterminal

<400> 31

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

ES 2 397 922 T3

Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser
 195 200 205

Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val
 210 215 220

Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser
 225 230 235 240

Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly
 245 250 255

Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Arg Gly Asp Ser Asp
 260 265

<210> 32
 <211> 270
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Secuencia de aminoácido de tTF-GNGRAHA con etiqueta de afinidad aminoterminal

10 <400> 32

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

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

Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met Gly Ser Gly Thr
 35 40 45

Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe
 50 55 60

Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr
 65 70 75 80

Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr
 85 90 95

Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val
 100 105 110

Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val
 115 120 125

Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu
 130 135 140

Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser
 145 150 155 160

Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg
 165 170 175

Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe
 180 185 190

ES 2 397 922 T3

Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser
195 200 205

Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val
210 215 220

Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser
225 230 235 240

Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly
245 250 255

Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Asn Gly Arg Ala His Ala
260 265 270

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de fusión, que comprende
 - 5 a) un péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, que permite unir selectivamente los polipéptidos de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales; y
 - b) el factor tisular TF (Tissue Factor) o un fragmento del mismo, estando caracterizado el factor tisular y el fragmento porque pueden activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las

10 células endoteliales de los vasos tumorales,

 en el que los péptidos a) y b) están unidos entre sí directamente o mediante un conector que presenta hasta 15 aminoácidos, caracterizado porque el péptido, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales está unido al extremo C del péptido, que puede activar la

15 coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales.
2. Polipéptido de fusión según la reivindicación 1, que consiste en los péptidos a) y b), y en un conector que presenta hasta 15 aminoácidos.
- 20 3. Polipéptido de fusión según la reivindicación 1, en el que los péptidos a) y b) están directamente unidos entre sí.
4. Polipéptido de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el péptido, que puede activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales es el factor tisular TF, que presenta la secuencia mostrada en SEC ID NO: 1.
- 25 5. Polipéptido de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el péptido, que puede activar la coagulación sanguínea cuando el polipéptido de fusión se une a las células endoteliales de los vasos tumorales es un fragmento del factor tisular TF, que presenta preferentemente la secuencia mostrada en SEC ID NO: 2.
- 30 6. Polipéptido de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales presenta una estructura lineal o cíclica.
- 35 7. Polipéptido de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el péptido que presenta de 3 a 30 aminoácidos, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales comprende la secuencia de aminoácidos RGD o NGR.
- 40 8. Polipéptido de fusión según la reivindicación 7, caracterizado porque el péptido, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales se selecciona de entre el grupo constituido por GRGDSP y GNGRAHA.
- 45 9. Polipéptido de fusión según la reivindicación 7, caracterizado porque el péptido, que permite unir selectivamente el polipéptido de fusión a las células endoteliales de los vasos tumorales se selecciona de entre el grupo constituido por GCNGRCG, GCNGRCVSGCAGRC, GCVLNGRMEC y GALNGRSHAG.
10. Polipéptido de fusión según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque presenta una de las secuencias mostradas en SEC ID NO: 3-8.
- 50 11. Ácido nucleico, que codifica un polipéptido de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Ácido nucleico según la reivindicación 11, caracterizado porque presenta una de las secuencias mostradas en SEC ID NO: 10-15.
- 55 13. Vector, que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11 o 12.
14. Célula, que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11 o 12, o un vector según la reivindicación 14.
- 60 15. Medicamento, que comprende un polipéptido de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 10, un ácido nucleico según la reivindicación 11 o 12, un vector según la reivindicación 13 o una célula según la reivindicación 14.
16. Medicamento según la reivindicación 15, que comprende además vehículos, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Fig. 1:

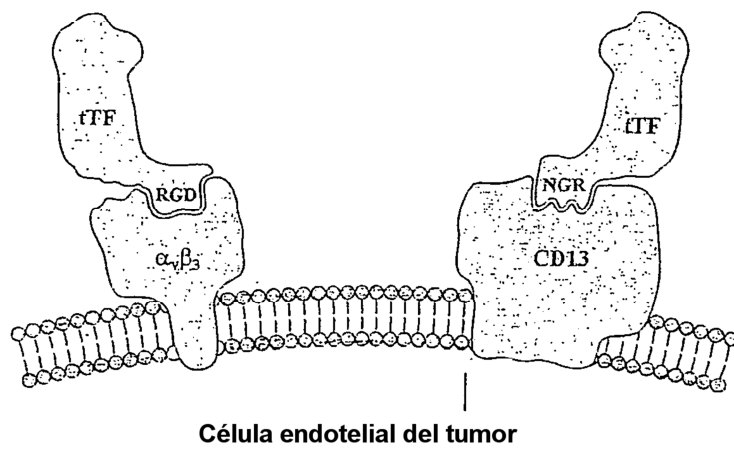


Fig. 2:

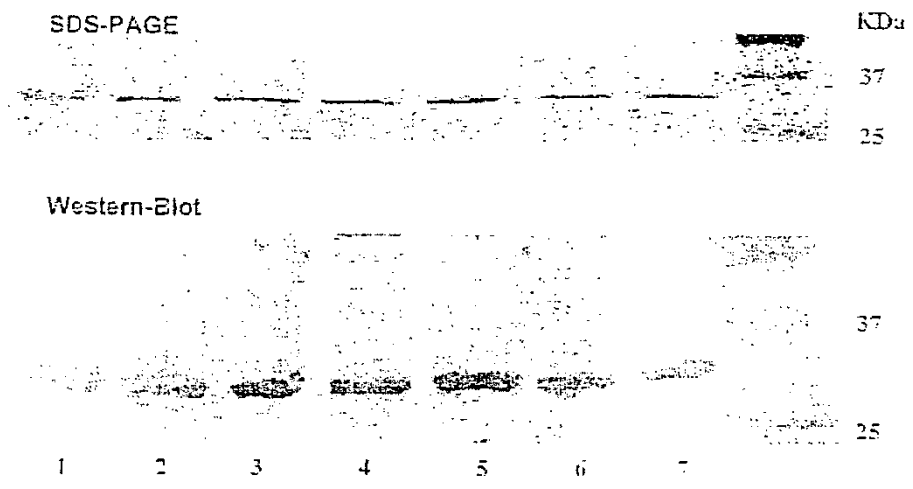


Fig. 3:

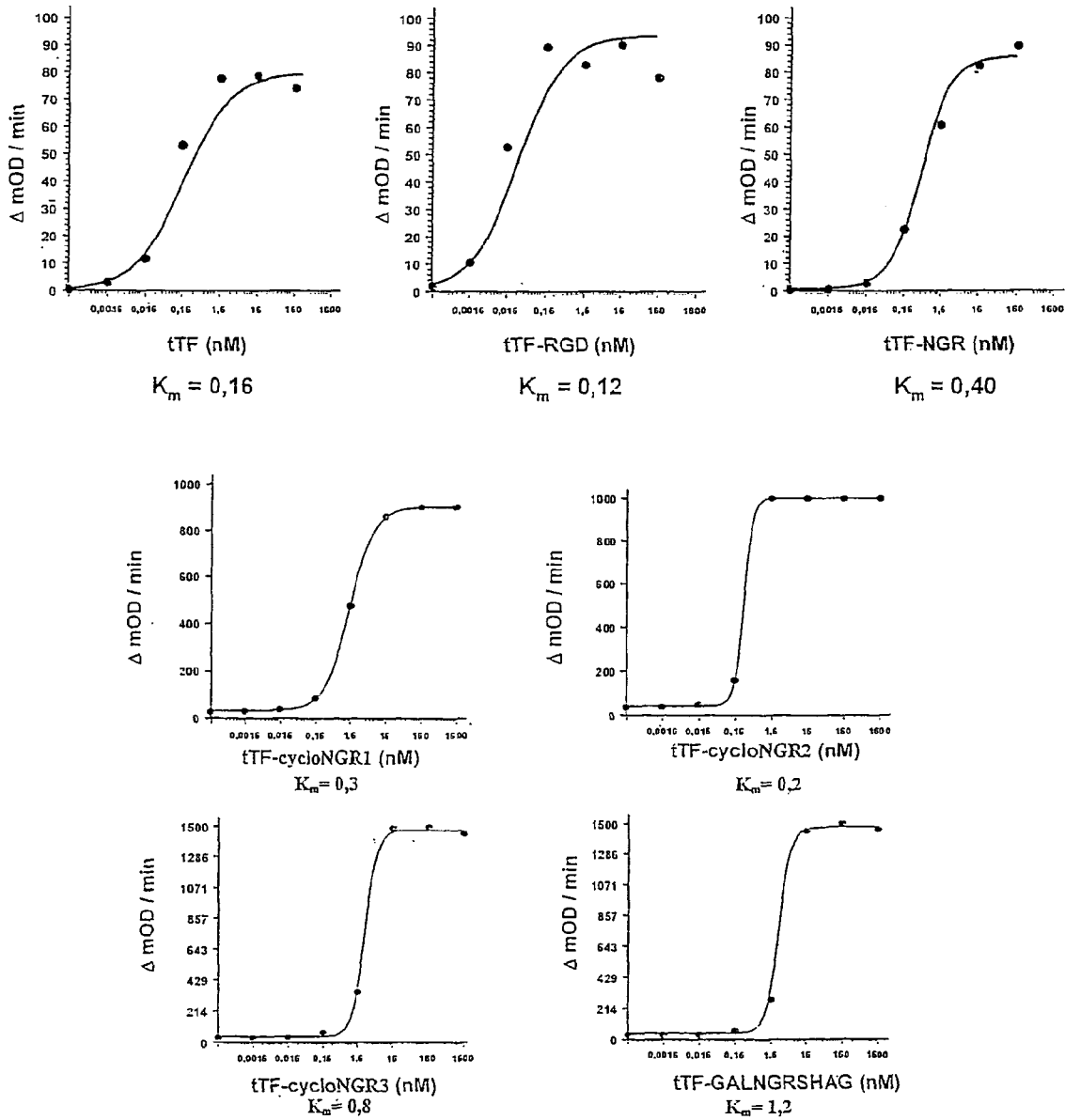


Fig. 4

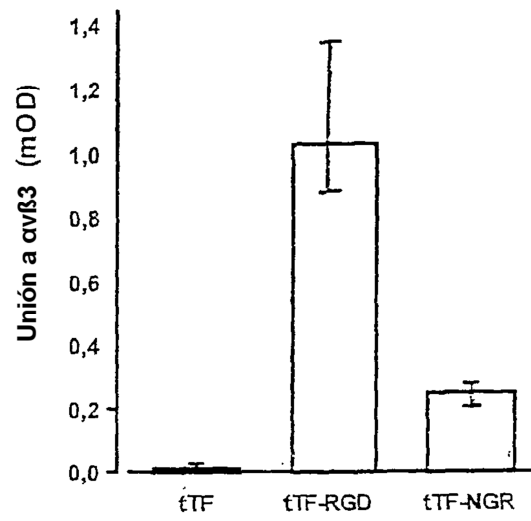


Fig. 5:

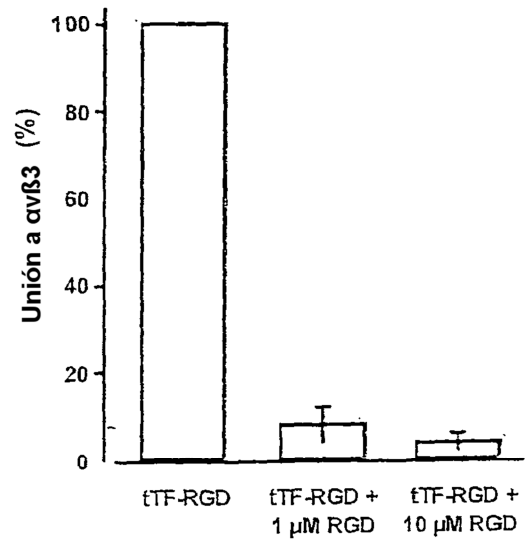


Fig. 6:

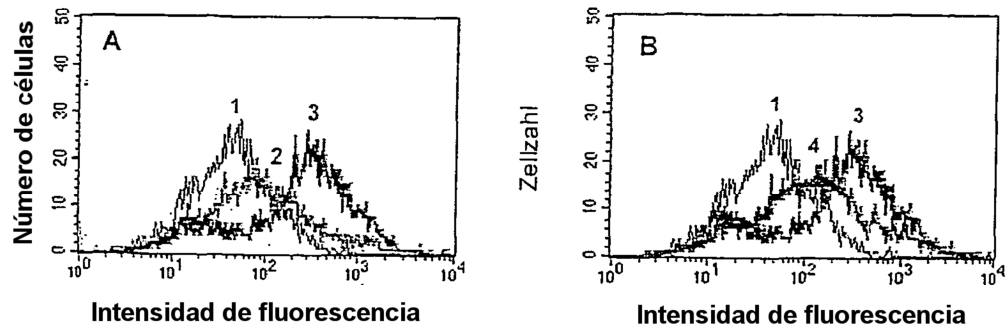


Fig. 7:

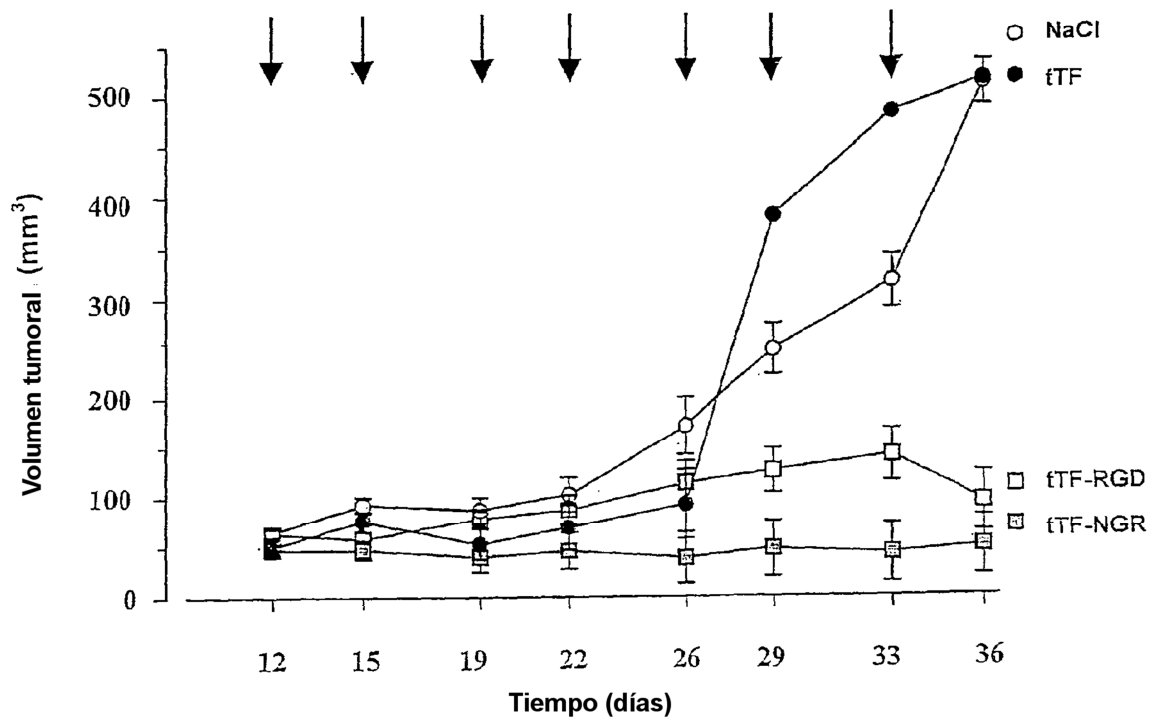


Fig. 8:

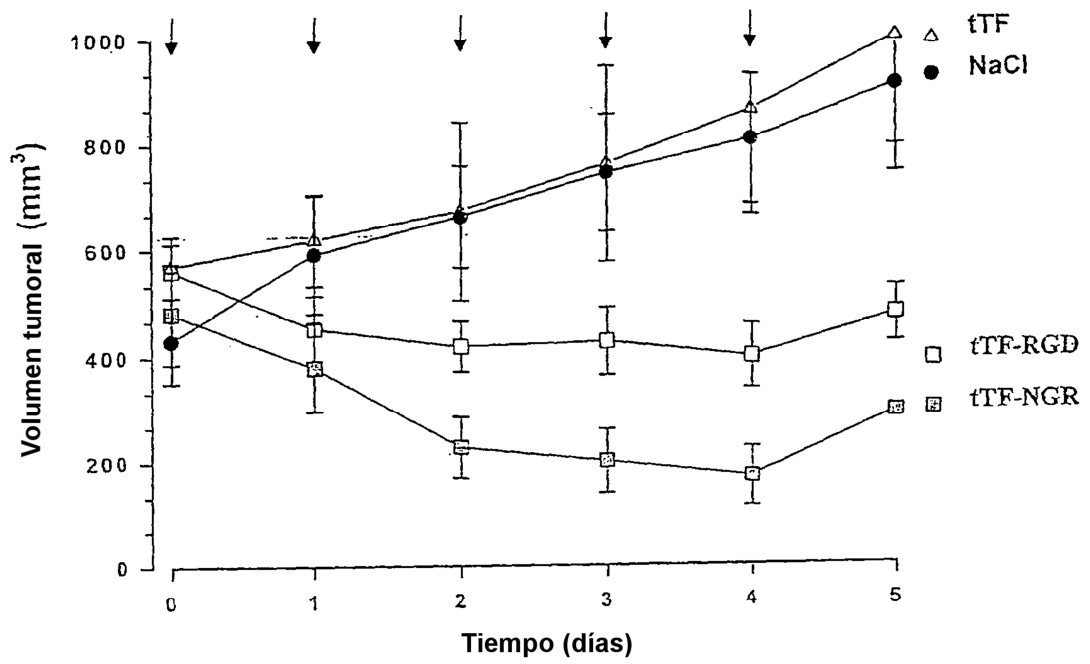


Fig. 9:

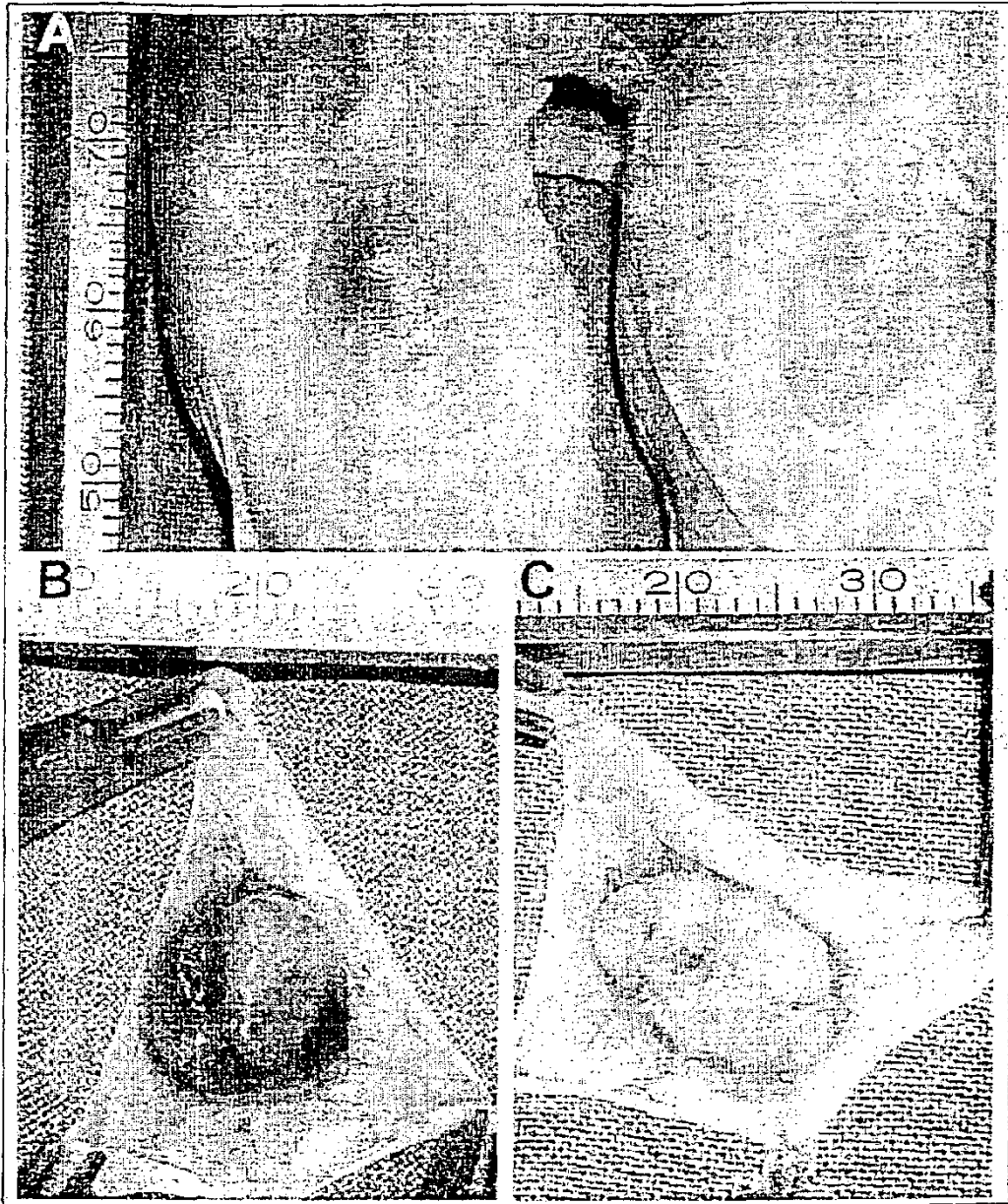


Fig. 10:

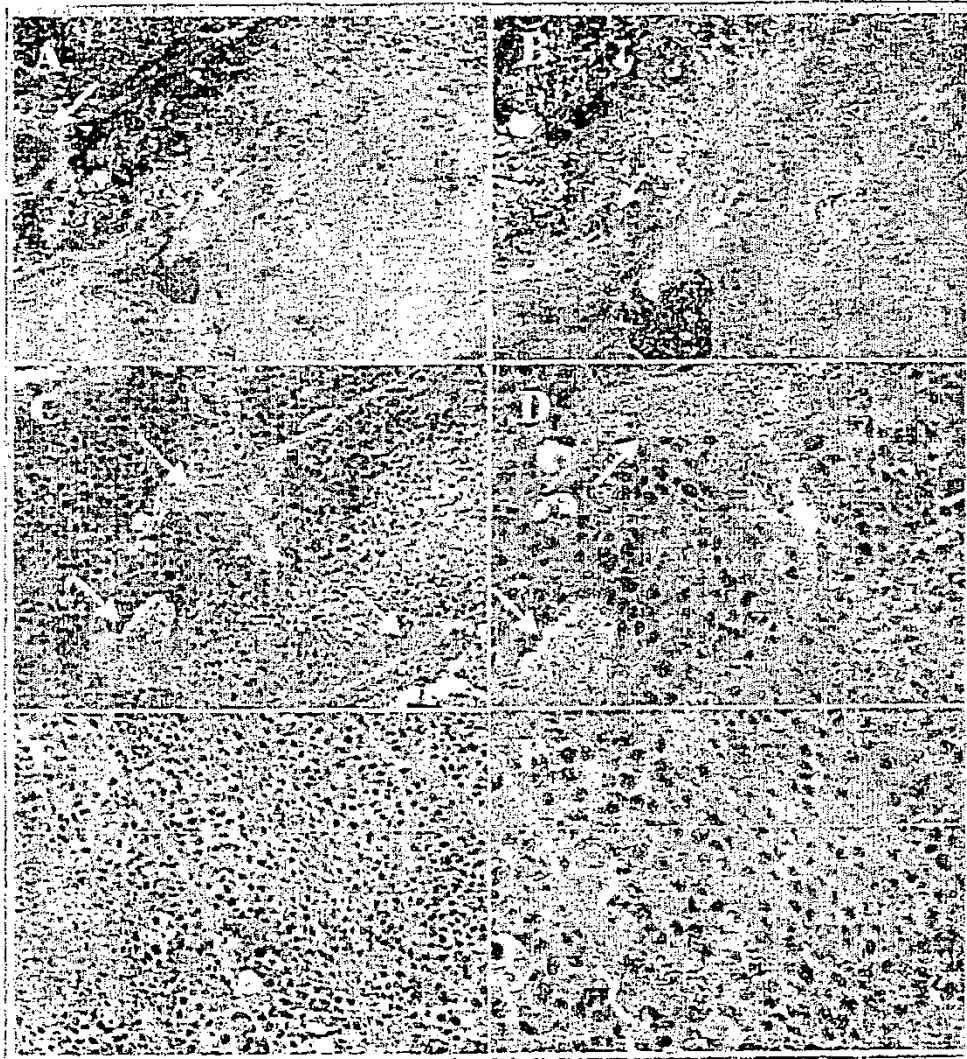


Fig. 11:

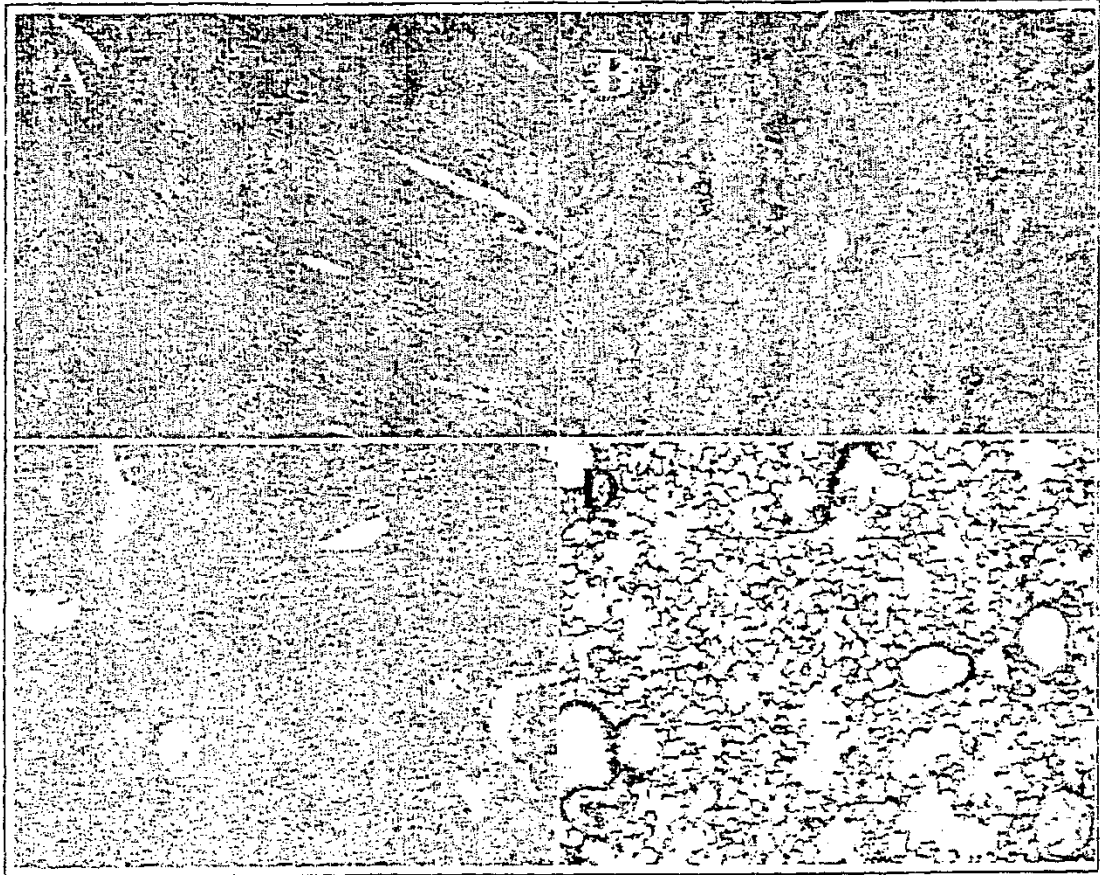


Fig. 12:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS KCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFREIFYIIGAVVFVVIILVILAILSLHKCRKAGVQSW
KENSPLNVS

Fig. 13:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS KCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFR

Fig. 14:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS^CKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY^TTLYYWKSSSSGK^KTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF^SVQAVIPSR^TTVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGRGDSD

Fig. 15:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS^CKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY^TTLYYWKSSSSGK^KTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF^SVQAVIPSR^TTVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGNGRAHA

Fig. 16

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS^CKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY^TTLYYWKSSSSGK^KTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF^SVQAVIPSR^TTVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGALNGRSHAG

Fig. 17:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS KCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGCNGRCG

Fig. 18:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS KCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGCNGRCVSGCAGRC

Fig. 19:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKS KCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGCVLNGRMEC

Fig. 20:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATTGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGA ACTCCCCAGAGTTACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
 CAGCCAA CAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 ACACITTAATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA ACTACTGTTTCAAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAAGGGGAATTCAGA

Fig. 21:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATTGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGA ACTCCCCAGAGTTACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
 CAGCCAA CAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 ACACITTAATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA ACTACTGTTTCAAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAAGGGGAATTCAGAG
 GAAGAGGTGATTCTCCA

Fig. 22:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATTGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGA ACTCCCCAGAGTTACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
 CAGCCAA CAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 ACACITTAATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA ACTACTGTTTCAAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAAGGGGAATTCAGAG
 GTAACCGGAAGAGCACAATGCA

Fig. 23:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGA ACTCCCCAGAGITCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
 CAGCCAACAATT CAGAGTTTTGAA CAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 AACTTTATTATTGAAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA ACTACTGTTTCAGTGTTC AAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
 GTGCTTTAAATGGAAGATCTCACGCTGGT

Fig. 24:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGA ACTCCCCAGAGITCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
 CAGCCAACAATT CAGAGTTTTGAA CAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 AACTTTATTATTGAAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA ACTACTGTTTCAGTGTTC AAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
 GCTGCAACGGTAGATGTGGT

Fig. 25:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGA ACTCCCCAGAGITCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
 CAGCCAACAATT CAGAGTTTTGAA CAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 AACTTTATTATTGAAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA ACTACTGTTTCAGTGTTC AAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
 GTTGAATGGAAGATGTGTTTTCTGGATGTGCAGGACCATGT

Fig. 26:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
 TTTTGGAGTGGGAACCCAAAACCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
 ATFGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
 GATGTGAAGCAGACGTA CTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCCGGT
 TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTGGGA
 CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
 GACTTTAGTCA GAAGGAACAACACTTTCTTAAGCCTCCGGGATGTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
 ACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACAATAATGAGTTT
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
 GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
 GATGCGTCTTAAATGGTAGGATGGAATGC

Fig. 27:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
 B: 5'-CGGGATCCTATTATCTGAATTCGGCTTCTCTCTGGCCCAT-3'

Fig. 28:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
 B: 5'-CGGGATCCTATTATGGAGAATCACCTCTTCTCTGAATTC-3'

Fig. 29:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
 B: 5'-CGGGATCCTATTATGCATGTGCTCTTCCGTTACCTCTGAATTC-3'

Fig. 30:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
 B: 5'-CGGGATCCTATTAAACCACTCTACCGTTGCAGCCTCTGAATTC-3'

Fig. 31:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTAACATCGTCCTGCACATCCAGAAACACATCTTCCATTACAACC
TCTGAATTCCCC-3'

Fig. 32:

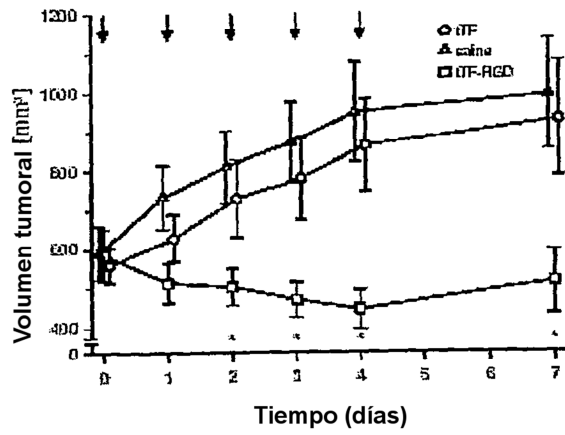
A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTA GCA TTC CAT CCT ACC ATT TAA GAC GCA TCC TCTGAATTCCCC-3

Fig. 33:

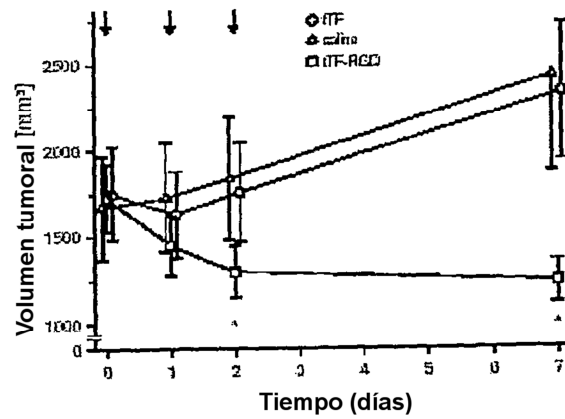
A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTA ACCAGCGTGAGATCTTCCATTAAAGCACCTCTGAATTCCCC-3'

Fig. 34

a



b



c

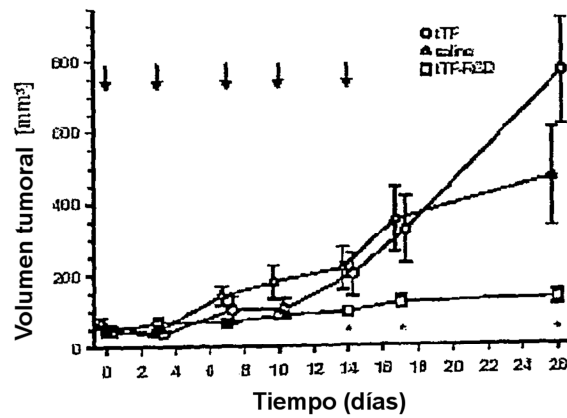


Fig. 35

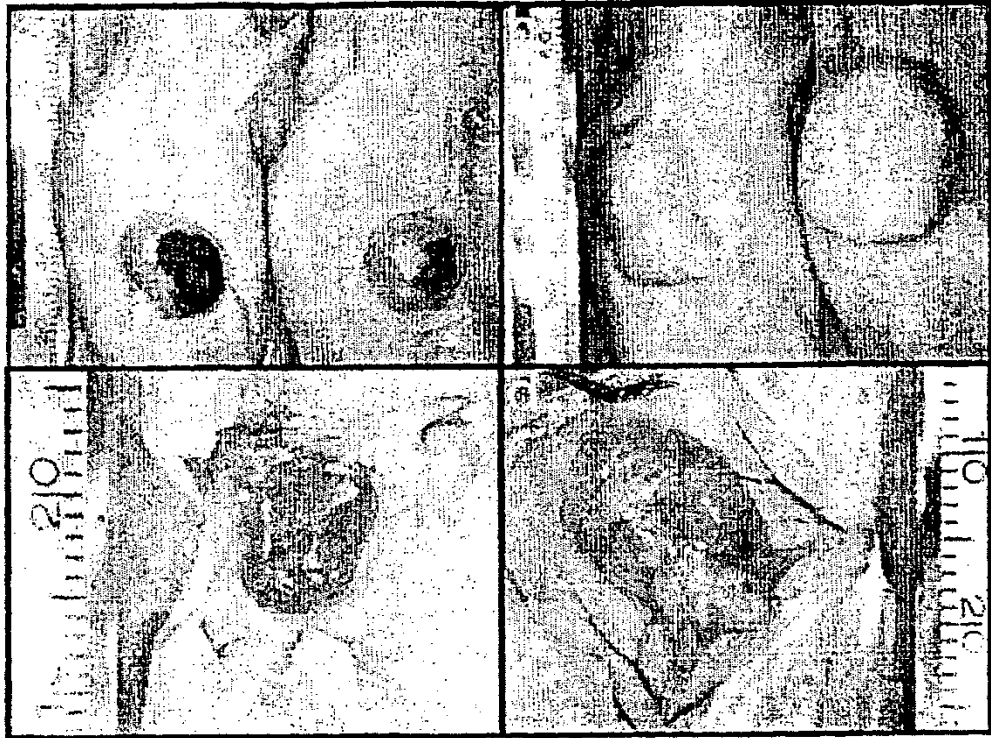


Fig. 36

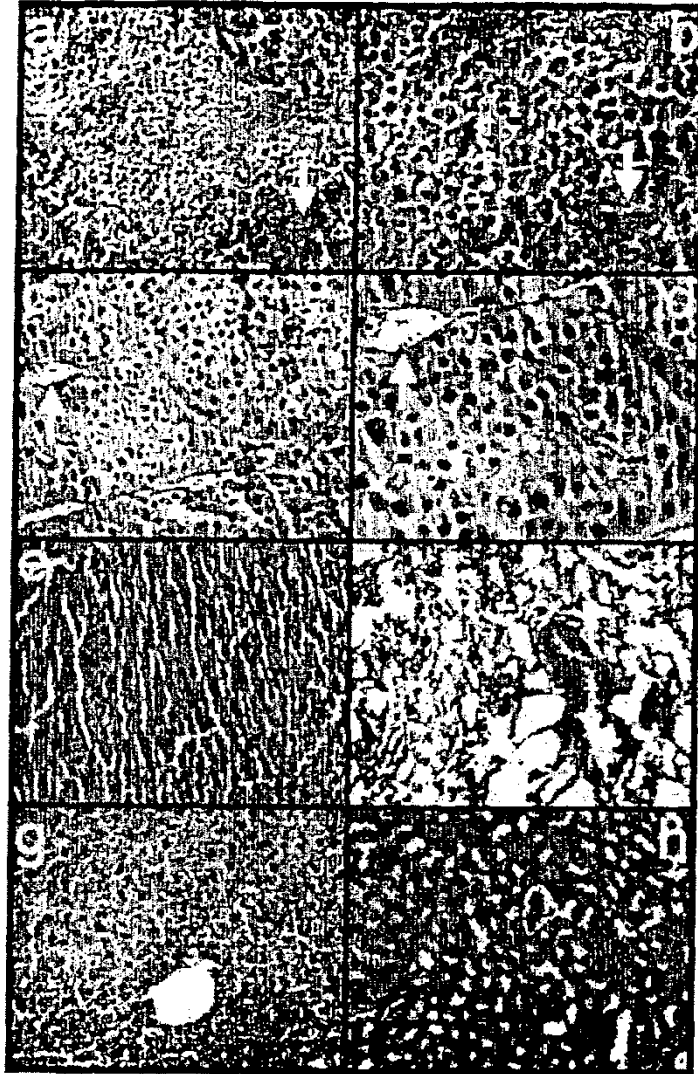


Fig. 37

