

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 929**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007** **E 07763819 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013** **EP 2041283**

54 Título: **Proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC) como sensibilizantes quimioterapéuticos**

30 Prioridad:

**26.06.2006 US 816316 P**

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

**10.06.2013**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA  
(100.0%)  
INDUSTRY LIASON OFFICE 103-6190  
AGRONOMY ROAD  
VANCOUVER, BRITISH COLUMBIA V6 1Z3, CA**

72 Inventor/es:

**TAI, ISABELLA, T.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 406 929 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

Proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC) como sensibilizantes quimioterapéuticos

**Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones sensibilizantes de terapia del cáncer y a procedimientos, específicamente polipéptidos y polinucleótidos relacionados con la proteína SPARC y el gen *SPARC*.

**Antecedentes de la invención**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en seres humanos y, aunque la quimioterapia, la radioterapia y la intervención quirúrgica convencionales reducen con éxito la carga tumoral en muchos casos, la resistencia a la intervención quimioterapéutica no es poco frecuente, especialmente en tumores sólidos. La resistencia se desarrolla tras la exposición a la quimioterapia y además impide la regresión y la cura del tumor. Es esta resistencia quimioterapéutica que conduce al fracaso del tratamiento lo que da lugar a las elevadas tasas de mortalidad en el cáncer.

La base molecular de la resistencia quimioterapéutica es principalmente genética y puede tomar muchas formas. Muchas mutaciones responsables del desarrollo inicial de los tumores pueden también contribuir a la resistencia a los fármacos. Por ejemplo, la pérdida de la función génica de reparación de los apareamientos erróneos del ADN (MMR) se ha asociado con una aparición más rápida de la resistencia farmacológica clínica en algunos cánceres (de las Alas M.M., et al., 1997. J Natl Canc Inst 89:1537-41; Lin X. y Howell, S.B. 1999. Mol Pharmacol 56:390-5) y las mutaciones en el gen K-ras (que se encuentra en aproximadamente el 40 % de los pólipos adenomatosos y adenocarcinomas) se asocian con un incremento de la tasa de recaídas, la mortalidad y mala respuesta a la quimioterapia (Arber N. y col. 2000, Gastroenterology 118:1045-1050). La expresión aberrante y la regulación alterada de las proteínas implicadas en el ciclo de replicación celular normalmente estrechamente regulado puede también proteger frente a tumores, en la bibliografía se puede hacer referencia libremente a estas proteínas como "oncogenes". Por ejemplo, se ha demostrado que los productos génicos p21 y p27 protegen a los tumores de la apoptosis provocada por varios agentes anticancerosos (Waldman T. et al., 1996. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. Nature 381:713 716; St. Croix B. et al., 1996. Nature Med 1996;2:1204-1210). Las moléculas de adhesión, como la E-cadherina, pueden también conferir resistencia a las células expuestas a agentes quimioterapéuticos (Skoudy A, y col., 1996. Biochem J 317: 279-84.). Los mecanismos implicados en la resistencia terapéutica son variados y pueden ser muy complejos.

Los quimiosensibilizantes pueden actuar junto con el agente quimioterapéutico o pueden servir para contrarrestar los mecanismos de resistencia en la célula. Los quimiosensibilizantes existentes incluyen fármacos de moléculas pequeñas, tales como fotosensibilizantes o inhibidores de la bomba de salida de fármaco y, más recientemente, oligonucleótidos antisentido. Nuevos compuestos con actividad quimiosensibilizante se incluyen en los documentos US5776925 y WO 02/00164, que proporcionan ejemplos de nuevos compuestos químicos que potencian la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos.

El documento US6001563 proporciona un procedimiento para identificar compuestos químicos que pueden tener actividad quimiosensibilizante.

Las secuencias antisentido con actividad quimiosensibilizante, que a menudo están dirigidos específicamente a oncogenes, son variadas y se pueden encontrar para casi cualquier diana. Por ejemplo, la survivina es una proteína que modula la apoptosis y con frecuencia se sobreexpresa en las células de cáncer (Krajewska, M. y col., 2003. Clin Cancer Res 9:4914; Kaur, P. y col., 2004. Arch Pathol Lab Med 128:39; Shariat, S.F. y col., 2004. La detección en orina de la survivina es un marcador sensible para el diagnóstico no invasivo del cáncer de vejiga. J Urol 171: 626). Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido de la survivina regulan por disminución la expresión de la survivina y sensibilizan a las células a los agentes quimioterapéuticos tales como docetaxel y etopósido (Hayashi, N. y col., 2005. Prostate 15:10-19).

De un modo similar, los sensibilizantes al tratamiento contra el cáncer pueden actuar junto con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo radioterapia, o pueden servir para contrarrestar los mecanismos de resistencia en la célula al agente terapéutico para el cáncer.

La proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC) es un ejemplo de un gen con expresión significativamente disminuida en líneas celulares resistentes a múltiples fármacos in Vitro, con un posible papel supresor tumoral (Tai, I.T. y col., 2005. J. Clin Invest. 115:1492-1502). La SPARC, también conocida como osteonectina, pertenece a una familia de proteínas matricelulares que tienen propiedades de contraadhesión, que rompe las interacciones célula-matriz (Bornstein P. 1995. J.Cell Biol 130:503-6; Sage E. H. and Bornstein P. 1991. J Biol Chem; 266:14831-4).

Se ha demostrado que la SPARC desempeña un papel en la mineralización ósea, remodelado tisular, migración de células endoteliales, morfogénesis y angiogénesis (Latvala T. y col., 1996. Exp Eye Res. 63:579-84; Hasselaar P. y Sage EH. 1992. J Cell Biochem. 49:272-83; Mason I.J. y col., 1986. EMBO J. 5:1831-7; Strandjord T.P. y col., 1995. Am J Respir Cell Mol Biol. 13:279-87; Kupprion C, y col., 1998. J Biol Chem. 273:29635-40; Lane T.F. y col., 1994. J Cell Biol. 125: 929-43).

Se describen algunos péptidos en N-terminal y C-terminal de la SPARC murina que bloquean la actividad anti-diseminación mediada por SPARC en células endoteliales aórticas bovinas en cultivo (Lane TF y Sage, EH 1990, J. Cell Biol 111:3065-3076).

- 5 Un péptido correspondiente a un segmento del dominio de la folistatina inhibe la migración de las células endoteliales in vitro y la angiogénesis en un modelo de ensayo corneado en ratas (Chlenski y col., 2004. Cancer Res. 64:7420-7425)

Algunos péptidos corresponden a la región catiónica de la SPARC murina y actúan como estimuladores del crecimiento de capilares in vitro e in vivo. No obstante, la actividad de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  solo no parece ser suficiente para que un péptido estimule la angiogénesis (Lane y col., 1994. J Cell Biol 125:929-943).

- 10 Estudios adicionales sugieren que la escisión de la SPARC por la MMP-3 da como resultado péptidos que afectan a la angiogénesis (Sage y col., 2003 J. Biol Chem 287: 37849-37857).

- 15 La SPARC tiene también un papel en la neoplasia maligna, dado que la expresión génica y proteica variable de la SPARC se ha vinculado a la progresión del cáncer en una serie de tumores (Yiu, G.K., y col., 2001. Am J.Pathol 159:609-622; Rempel S.A. y col., 2001. J Neurooncol 53:149-60; Schultz C. y col., 2002. Cancer Res 62:6270-7; .Porter P.L. y col., 1995. J Histochem Cytochem 43:791-800). Los estudios en animales defectivos en SPARC revelan que la pérdida de SPARC potencia el crecimiento de xenoinjertos tumorales de cánceres pancreáticos y de pulmón (Puolakkainen P.A. y col., 2004. Mol Cancer Res 2:215-24; Brekken R.A. y col., 2003. J Clin Invest 111:487-95) (documentos WO 2006/112930 A; EP 1 033 401 A; Base de datos de EMBL 19 de julio de 2005, Osada, N. y col., "clone: QccE10162, similar to human", Acc. No. Q4R5R0, recuperado de EBI).

- 20 El uso de la proteína SPARC intacta aislada como quimiosensibilizante se describe en el documento WO 2004/064785.

### **Sumario de la invención**

- 25 De acuerdo con una realización de la invención, como se define en las reivindicaciones, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de SEC ID Nº 2 o la SEC ID Nº 4 o la SEC ID Nº 6 o la SEC ID Nº 11 o la SEC ID Nº 12 o un polipéptido aislado que comprende la secuencia de SEC ID Nº 3 o la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 7 o la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9. En una realización relacionada, la invención proporciona polipéptidos aislados, en la que los polipéptidos tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID Nº 3, 5 o 7-10 y hasta 50 aminoácidos adicionales, preferentemente hasta 25 aminoácidos adicionales, más preferentemente hasta 15 aminoácidos adicionales, lo preferentemente hasta 10 aminoácidos adicionales, en la que los aminoácidos adicionales se localizan en el extremo amino o carboxilo o en ambos extremos. Los polipéptidos resultantes, fabricados de acuerdo con la invención, incluyen polipéptidos con una longitud total de menos de 50 aminoácidos. En una realización adicional relacionada, la invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº 3, 5 y 7-10 con aminoácidos adicionales localizados en el extremo amino o carboxilo o en ambos extremos.

- 35 De acuerdo con otra realización de la invención se proporciona un polipéptido aislados seleccionado de los aminoácidos 17-153 de la SEC ID Nº 10, en la que el polipéptido tiene actividad sensibilizante a la terapéutica para el cáncer. De acuerdo con otra realización de la invención se proporciona un polinucleótido aislado seleccionado de los aminoácidos 157-56 de la SEC ID Nº 10, en la que el polinucleótido tiene actividad sensibilizante a la terapéutica para el cáncer cuando se expresa.

- 40 De acuerdo con otra realización se proporciona un medicamento que comprende las SEC ID Nº 2, la SEC ID Nº 3, la SEC ID Nº 4, la SEC ID Nº 5, la SEC ID Nº 6, la SEC ID Nº 7, la SEC ID Nº 8, la SEC ID Nº 9, la SEC ID Nº 10, la SEC ID Nº 11 o la SEC ID Nº 12. La invención puede comprender además un medicamento que comprende la SEC ID Nº 3 o la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 7 o la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9, y un agente quimioterapéutico. La invención puede comprender además un medicamento que comprende la SEC ID Nº 3 o la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 7 o la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9 en combinación con agente terapéutico del cáncer, incluido, sin limitaciones, en el que el agente terapéutico para el cáncer se selecciona del grupo que consiste en uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes radioterapéuticos, uno o más agentes terapéuticos alternativos y combinaciones de los mismos.

- 50 De acuerdo con otra realización se proporciona un vector que comprende las SEC ID Nº 2 o la SEC ID Nº 4 o la SEC ID Nº 6 o la SEC ID Nº 11 o la SEC ID Nº 12 o una célula huésped que expresa un vector que comprende las SEC ID Nº 2 o la SEC ID Nº 4 o la SEC ID Nº 11 o la SEC ID Nº 12.

- 55 De acuerdo con otra realización se proporciona un procedimiento un de sensibilización de una célula cancerosa a un régimen terapéutico para el cáncer, comprendiendo el procedimiento el suministro de un vector que comprende las SEC ID Nº 2 o la SEC ID Nº 4 o la SEC ID Nº 6 o la SEC ID Nº 11 o la SEC ID Nº 12, a una célula; en el que se expresa la secuencia portada por el vector y se trata la célula con un agente quimioterapéutico. De acuerdo con una realización relacionada de la invención se proporciona un procedimiento de sensibilización de una célula cancerosa a un régimen terapéutico para el cáncer, comprendiendo el procedimiento el suministro de un vector que comprende

- las SEC ID Nº 3 o la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 7 o la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9 a una célula y, después, el tratamiento de la célula con un agente terapéutico para el cáncer. Estos procedimientos de sensibilizar células cancerosas se puede poner en práctica de acuerdo con la invención, en los que el agente terapéutico para el cáncer se selecciona del grupo que consiste en uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes radioterapéuticos, uno o más agentes terapéuticos alternativos y combinaciones de los mismos.
- De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un polipéptido que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos de la SEC ID Nº 3 o la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 7 o la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9. El polipéptido puede además combinarse o administrarse en combinación con un medicamento que comprende un agente quimioterapéutico.
- De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un polipéptido que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos de la SEC ID Nº 3 o la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 7 o la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9, y un agente quimioterapéutico.
- De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un medicamento que comprende un polipéptido que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos de la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9, y un agente quimioterapéutico. La invención puede comprender además un medicamento que comprende la SEC ID Nº 8 y la SEC ID Nº 9, y un agente quimioterapéutico.
- En otro aspecto más, la invención proporciona polipéptidos sensibilizantes aislados comprendidos en las secuencias SEC ID Nº 3, 5 and 7-10, en las que uno o más aminoácidos ha sufrido una mutación conservadora. En el presente documento también se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican dichos polipéptidos con mutación conservadora.
- De acuerdo con otra realización se proporciona un procedimiento de sensibilización de una célula cancerosa a un agente terapéutico para el cáncer, en el que el procedimiento incluye:
- (a) suministrar un polipéptido seleccionado de una o más de las SEC ID Nº 3, la SEC ID Nº 5, la SEC ID Nº 7, la SEC ID Nº 8 y la SEC ID Nº 9, a una célula y (b) tratar la célula con el agente terapéutico para el cáncer.
- De acuerdo con otra realización se proporciona un procedimiento de sensibilización de una célula cancerosa a un agente terapéutico para el cáncer, en el que el procedimiento incluye:
- (a) suministrar un vector que comprende un polinucleótido seleccionado de una o más de las SEC ID Nº 2, la SEC ID Nº 4, la SEC ID Nº 6, la SEC ID Nº 11 y la SEC ID Nº 12, a una célula; (b) expresar la secuencia portada por el vector y (c) tratar la célula con un agente terapéutico para el cáncer.
- De acuerdo con otra realización de la invención se proporciona un vector que incluye un polinucleótido aislado seleccionado de uno o más de los siguientes: SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 11, SEC ID Nº 12 y fragmentos, variantes o análogos de los mismos, en el que los fragmentos, variantes o análogos de los mismos conservan la actividad de sensibilización terapéutica cuando se expresa.
- De acuerdo con otra realización de la invención se proporciona una célula que incluye un polinucleótido descrito en el presente documento, en el que el polinucleótido está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- De acuerdo con otra realización de la invención se proporciona una célula transfectada con el vector como se describe en el presente documento o progenie del mismo.
- De acuerdo con otra realización de la invención se proporciona un procedimiento de expresión de un polipéptido, que incluye: (a) proporcionar un vector de expresión que codifica el polipéptido, en el que el polipéptido se selecciona de una o más de las siguientes: SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8, SEC ID Nº 9 y fragmentos, variantes, análogos o polipéptidos con mutaciones conservadoras de los mismos, en el que los fragmentos, variantes, análogos o polipéptidos con mutaciones conservadoras de los mismos pueden conservar la actividad de sensibilización terapéutica; (b) introducir el vector en una célula; y (c) mantener la célula en condiciones que permitan la expresión.
- Los fragmentos, variantes, análogos o polipéptidos con mutaciones conservadoras se pueden determinar mediante uno o más de los siguientes: % de identidad, % de similitud y el grado de conservación como se describe en el presente documento.
- Los fragmentos de polinucleótido, las variantes de polinucleótido o análogos de polinucleótido de los mismos mediante uno o más de los siguientes: % de identidad, % de similitud y la capacidad para hibridar en condiciones muy rigurosas, como se describe en el presente documento.
- El suministro y el tratamiento pueden ser simultáneos. El suministro puede preceder al tratamiento o, como alternativa, el tratamiento puede preceder al suministro.

El agente terapéutico para el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes radioterapéuticos, uno o más agentes terapéuticos alternativos y combinaciones de los mismos.

5 El polipéptido se puede seleccionar de uno o más de los siguientes: SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 y la SEC ID N° 9

El polinucleótido se puede seleccionar de uno o más de los siguientes: SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 6, SEC ID N° 11 y la SEC ID N° 12.

10 La célula cancerosa se puede seleccionar en base a que sea resistente a un régimen terapéutico. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden también comprender una etapa de selección para una célula cancerosa que es resistente a un régimen terapéutico.

El polinucleótido aislado se puede seleccionar de uno o más de los siguientes: SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 6, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12 y fragmentos, variantes o análogos de los mismos, en el que los fragmentos, variantes o análogos de los mismos conservan la actividad de sensibilización terapéutica cuando se expresa.

15 El polipéptido aislado se puede seleccionar de uno o más de los siguientes: SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9 y fragmentos, variantes o análogos de los mismos, en el que los fragmentos, variantes o análogos de los mismos conservan la actividad de sensibilización terapéutica. El polipéptido aislado se puede seleccionar de uno o más de los siguientes: SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9 y polipéptidos de los mismos con mutaciones conservadoras, en el que los polipéptidos de los mismos con mutaciones conservadoras conservan la actividad de sensibilización terapéutica al cáncer.

20 El polinucleótido aislado puede estar unido operativamente a una secuencia de control de la expresión. El vector puede ser adecuado para terapia génica.

La célula puede ser operable para expresar los polipéptidos descritos en el presente documento.

La introducción del vector en una célula se puede realizar in vivo. La introducción del vector en una célula se puede realizar ex vivo. La introducción del vector en una célula se puede realizar in vitro.

25 Otros aspectos y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención junto con las figuras adjuntas.

### **Breve descripción de las figuras**

En las figuras que ilustran las realizaciones de la invención:

30 Figura 1 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular de células MIP101 transfectadas transitoriamente con un vector que expresa la SPARC de longitud completa (SEC ID N° 1), la SEC ID N° 2 (dominio en el extremo N), la SEC ID N° 4 (dominio de tipo folistatina) O la SEC ID N° 6 (dominio EC) solo (barras de color negro) o transfectadas como se indica en lo que antecede, seguido por el tratamiento con irinotecán (500 µM) (barras de color blanco).

35 Figura 2 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular de células MIP/CPT (resistentes a CPT-11) transfectadas transitoriamente con un vector que expresa la SPARC de longitud completa (SEC ID N° 1), la SEC ID N° 2 (dominio en el extremo N), la SEC ID N° 4 (dominio de tipo folistatina) O la SEC ID N° 6 (dominio EC) solo (barras de color negro) o transfectadas como se indica en lo que antecede, seguido por el tratamiento con irinotecán (500 µM) (barras de color blanco).

40 Figura 3 Muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular de células MIP (sensibles a 5-FU) y MIP/5FU (resistentes a 5-FU) expuestas al péptido B8 a concentraciones bajas (96 µg/ml) y altas (200 µg/ml), solo o en combinación con 5FU (500 µM).

Figura 4 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular de células MIP (sensibles a 5-FU) y MIP/5FU (resistentes a 5-FU) expuestas al péptido B14 a concentraciones bajas (96 µg/ml) y altas (200 µg/ml), solo o en combinación con 5FU (500 µM).

45 Figura 5 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular de células MIP (sensibles a 5-FU) y MIP/5FU (resistentes a 5-FU) expuestas a los péptidos A, A1, A2 y A3 a concentraciones altas (200 µg/ml), solo o en combinación con 5FU (500 µM).

50 Figura 6 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular de células MIP (sensibles a 5-FU) y MIP/5FU (resistentes a 5-FU) expuestas a los péptidos de tipo manipulado B8 y B14 a concentraciones altas (200 µg/ml), solo o en combinación con 5FU (500 µM).

Figura 7 muestra los resultados de la sensibilización in vivo al agente quimioterapéutico 5-FU medido mediante el crecimiento tumoral en un sistema de xenoinjerto que comprende células tumorales control

transplantadas (crecimiento con y sin 5FU).

Figura 8 muestra los resultados de la sensibilización in vivo al agente quimioterapéutico 5-FU medido mediante el crecimiento tumoral en un sistema de xenoinjerto que comprende células tumorales transplantadas que expresan la SEC ID N° 2 /NT-Fragmento (crecimiento con y sin 5-FU).

5 Figura 9 muestra los resultados de la sensibilización in vivo al agente quimioterapéutico 5-FU medido mediante el crecimiento tumoral en un sistema de xenoinjerto que comprende células tumorales transplantadas que expresan la SEC ID N° 4 /FS-Fragmento (crecimiento con y sin 5-FU).

Figura 10 muestra los resultados de la sensibilización in vivo al agente quimioterapéutico 5-FU medido mediante el crecimiento tumoral en un sistema de xenoinjerto que comprende células tumorales transplantadas que expresan la SEC ID N° 6 /EC-Fragmento (crecimiento con y sin 5-FU).

### **Descripción detallada**

En la descripción siguiente se usa ampliamente una serie de términos, para facilitar la comprensión de la invención se proporcionan las definiciones siguientes.

15 La quimioterapia actual está limitada por la capacidad del paciente para tolerar el fármaco y la capacidad de la célula para aguantar los efectos citotóxicos del fármaco. Potenciar o imitar la expresión potenciada de una proteína con un papel supresor tumoral en la célula normal puede evitar los problemas de toxicidad de las moléculas pequeñas y puede tener una semivida eficaz más larga cuando se administra al paciente, lo que permite la reducción de la dosis haciendo que las células cancerosas sean más sensibles al agente quimioterapéutico.

20 Como se usa en el presente documento, un “medicamento” es una composición capaz de producir un efecto que se puede administrar a un paciente o sujeto de ensayo. El efecto puede ser químico, biológico o físico y el paciente o sujeto de ensayo puede ser un ser humano o un animal no humano, tal como un roedor o un ratón transgénico. La composición puede incluir moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas con una composición molecular distinta fabricadas sintéticamente, encontradas en la naturaleza o ser de origen sintético parcial. En este grupo se incluyen nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos péptidos o complejos que comprenden al menos una de estas entidades. El medicamento puede estar compuesto por la composición eficaz sola o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Como se usa en el presente documento, “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, antimicrobianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El excipiente puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal u oral. El excipiente puede incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de estos medios para la preparación de medicamentos se conoce en la técnica.

35 Como se usa en el presente documento, una “cantidad farmacológicamente eficaz” de un medicamento se refiere a usar una cantidad de un medicamento presente en una concentración tal que tenga como resultado un nivel terapéutico del fármaco suministrado en el tiempo que se usa el fármaco. Esto puede depender del modo de suministro, el periodo de tiempo de la dosis, la edad, el peso, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto que reciba el medicamento. La determinación de qué dosis es una “cantidad farmacológicamente eficaz” requiere la optimización de rutina, que está dentro de las capacidades de un experto en la técnica.

40 Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a un trastorno proliferativo producido o caracterizado por la proliferación de células que han perdido la sensibilidad al control del crecimiento normal. El término cáncer, como se usa en la presente solicitud, incluye tumores y cualquier otro trastorno proliferativo. Los cánceres del mismo tipo de tejido se suelen originar en el mismo tejido y se pueden dividir en diferentes subtipos en base a sus características biológicas. Cuatro categorías generales de cáncer son carcinoma (derivado del tejido epitelial), sarcoma (derivado de tejido conjuntivo o mesodérmico), leucemia (derivado de tejido formador de sangre) y linfoma (derivado de tejido linfático). Se conocen más de 200 tipos diferentes de cáncer y pueden afectar a cada órgano y tejido del cuerpo. Ejemplos específicos de cánceres que no limitan la definición de cáncer pueden incluir melanoma, leucemia, astrocitoma, glioblastoma, retinoblastoma, linfoma, glioma, linfoma de Hodgkin y leucemia linfocítica crónica. Ejemplos de órganos y tejidos que se pueden ver afectados por varios cánceres incluyen páncreas, mama, tiroides, ovarios, útero, testículos, próstata, tiroides, hipófisis, glándula suprarrenal, riñones, estómago, esófago, colon o recto, cabeza y cuello, huesos, sistema nervioso, piel, sangre, tejido nasofaríngeo, pulmones, tracto urinario, cuello uterino, vagina, glándulas exocrinas y glándulas endocrinas. Como alternativa, un cáncer puede ser multicéntrico o de un sitio primario desconocido (CUPS).

50 Como se usa en el presente documento, una “célula cancerosa” se refiere a una célula que ha sufrido un acontecimiento de transformación y cuyo crecimiento ya no está regulado en la misma medida que antes de dicho acontecimiento de transformación. Un tumor hace referencia a una acumulación de células cancerosas, a menudo encontradas como un grumo sólido o semisólido en o sobre el tejido de un paciente o sujeto de ensayo

Un cáncer o célula cancerosa se puede describir como “sensible a” o “resistente a” un régimen terapéutico o agente

quimioterapéutico dado en base a la capacidad del régimen para matar células cancerosas o disminuir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento del cáncer general (es decir, mediante la reducción de la angiogénesis) y/o inhibir la metástasis. Las células cancerosas que son resistentes a un régimen terapéutico pueden no responder al régimen y pueden contribuir a proliferar. Las células cancerosas que son sensibles a un régimen terapéutico pueden responder al régimen y producir muerte celular, una reducción del tamaño celular, reducción del crecimiento global (carga tumoral) o inhibición de la metástasis. Por ejemplo, deseablemente, esto se manifiesta en una reducción del tamaño del tumor, el crecimiento general/carga tumoral o la incidencia de metástasis de aproximadamente un 10 % o más, por ejemplo de aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, o más, hasta aproximadamente por 2, aproximadamente por 3, aproximadamente por 4, aproximadamente por 5, aproximadamente por 10, aproximadamente por 15, aproximadamente por 20 o más. La monitorización de una respuesta se puede conseguir mediante numerosos procedimientos patológicos, clínicos y de imagen como se describe en el presente documento y conocidos para los expertos en la técnica.

Un tema habitual para un agente quimioterapéutico o combinación de agentes es inducir la muerte de las células cancerosas. Por ejemplo, los aductos de ADN, tales como nitrosoureas, busulfán, tiotepa, clorambucilo, cisplatino, mitomicina, procarbazona o dacarbazina ralentizan el crecimiento de la célula cancerosa obligando a la célula en replicación a reparar el ADN dañado antes de la fase M del ciclo celular o pueden producir ellos mismos suficientes daños para desencadenar la apoptosis de la célula cancerosa. Con el variado arsenal de agentes quimioterapéuticos disponibles para el médico también se puede interferir en, por ejemplo, acontecimientos tales como la expresión o transcripción génica, la traducción de proteínas o la mutilación del ADN replicado, para ayudar a desencadenar procesos apoptóticos dentro de las células cancerosas. Como alternativa, un agente quimioterapéutico puede matar a la célula cancerosa por aspectos del sistema inmunitario humoral o adquirido del paciente o sujeto de ensayo, por ejemplo la cascada del complemento o el ataque de los linfocitos.

Aunque no se desea quedar ligado a teoría específica alguna, una célula cancerosa resistente a un agente quimioterapéutico o combinación de agentes puede luchar por su supervivencia transportando de forma activa el fármaco hacia fuera de la célula mediante, por ejemplo, sobreexpresión de transportador ABC p-glicoproteína MDR1 (FORD et al 1993. Cytotechnol. 12:171-212) o adquirir "contramutaciones" para contrarrestar los fármacos. Por ejemplo, las mutaciones en las enzimas de reparación del ADN que afectan a la capacidad para detectar daños en el ADN de las células pueden permitir la replicación del ADN dañado y permitir que las células cancerosas continúen replicándose y aumentando de tamaño el tumor. A medida que se acumulan las mutaciones, otros puntos reguladores que, de otro modo, actuarían en un ciclo celular normal dejan de funcionar y aparece el ciclo de crecimiento mal regulado. Otro aspecto de resistencia quimioterapéutica implica la evitación de las células tumorales de la apoptosis. Una respuesta normal del organismo huésped al crecimiento celular mal regulado es iniciar apoptosis y eliminar la célula defectuosa antes de que comience la cascada en replicación no controlada. No obstante, una célula cancerosa puede trastocar esto mediante, por ejemplo, alteración de los acontecimientos de transducción de señal, pérdida de dependencia de adhesión o inhibición por contacto en la célula cancerosa o pérdida de factores de estimulación de la apoptosis, a menudo considerados "supresores tumorales", por ejemplo p53, BRCA1 o RB. La importancia de esta sensibilidad a la apoptosis en el tratamiento del cáncer está respaldada por recientes pruebas indicativas de que la selectividad de la quimioterapia para los relativamente pocos tumores curados alguna vez únicamente con fármacos depende, en gran medida, de su fácil sensibilidad para sufrir apoptosis (JOHNSTONE y col., 2002. Cell. 108(2):153-64).

Como se usa en el presente documento, un "régimen terapéutico" o "terapia" se refiere a la administración de al menos un agente que es dañino para las células cancerosas. Regímenes terapéuticos adecuados para su uso de acuerdo con la invención incluyen entre otros, "regímenes quimioterapéuticos", "regímenes radioterapéuticos", "régimen terapéutico alternativo" y combinaciones de los mismos.

Como se usa en el presente documento, un "régimen quimioterapéutico" o "quimioterapia" se refiere a la administración de al menos un agente quimioterapéutico que es dañino para destruir las células cancerosas. Un clínico tiene a su disposición una miríada de estos agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos se pueden administrar a un sujeto en una dosis de un solo bolo o se pueden administrar en dosis más pequeña en el tiempo. Se puede usar un agente quimioterapéutico único (monoterapia) o más de uno en combinación (tratamiento de combinación). La quimioterapia se puede usar sola para tratar algunos tipos de cáncer. Como alternativa, la quimioterapia se puede usar en combinación con otros tipos de tratamiento, por ejemplo radioterapia o tratamientos alternativos (por ejemplo inmunoterapia) como se ha descrito en el presente documento. Adicionalmente se puede administrar un quimiosensibilizante como un tratamiento de combinación con un agente quimioterapéutico.

Como se usa en el presente documento, un "agente quimioterapéutico" hace referencia a un medicamento que se puede usar para tratar el cáncer y, en general, tiene la capacidad de matar células cancerosas directamente. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, hormonas y antagonistas y agentes varios. Ejemplos de nombres alternativos se indican entre paréntesis. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas de nitrógeno tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo; etiléniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina y tiotepa; alquilsulfonatos tales como busulfán, nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), semustina (metil-CCNU), lomustina (CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); antagonistas de la síntesis de ADN tales como estramustina

fosfato; y triazinas tales como dacarbazina (DTIC, dimetil-triazenoimidazolcarboxamida) y temozolomida. Ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos del ácido fólico tales como metotrexato (ametofterina), análogos de pirimidina tales como fluorouracil (5-fluorouracilo, 5-FU, 5FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina, FUDR), citarabina (citosa arabinósido) y gemcitabina; análogos de purina tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP), tioguanina (6-tioguanina, TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina, desoxicoformicina), cladribina y fludarabina e inhibidores de la topoisomerasa tales como amsacrina. Ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; taxanos tales como paclitaxel y docetaxel (Taxotere); epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; camptotecinas tales como topotecán e irinotecán; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina, rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, mitomicina (mitomicina C), idarubicina, epirubicina; enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como interferón alfa e interleucina 2. Ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen agonistas de la hormona liberadora luteinizante tales como buserelina; adrenocorticosteroides tales como prednisona y preparaciones relacionadas; progestinas tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógenos tales como dietilestilbestrol y etinil estradiol y preparaciones relacionadas; antagonistas de estrógenos tales como tamoxifeno y anastrozol; andrógenos tales como propionato de testosterona y fluoximesterona y preparaciones relacionadas, antagonistas de andrógenos tales como flutamida y bicalutamida; y análogos de la hormona liberadora de gonadotropina tales como leuprolida. Ejemplos de otros agentes incluyen talidomida, complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP), oxaliplatino y carboplatino; antracénodionas tales como mitoxantrona; ureas sustituidas tales como hidroxiurea; derivados de metilhidrazina tales como procarbazona (N-metilhidrazina, MIH); supresores suprarrenales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; agonistas de RXR tales como bexaroteno; e inhibidores de la tirosina quinasa tales como imatinib. Una persona versada en la técnica conocerá nombres alternativos y nombres comerciales de estos y ejemplos adicionales de agentes quimioterapéuticos y sus procedimientos de uso incluidos los regímenes de dosis y administración y se pueden encontrar en, por ejemplo, "The Pharmacological basis of therapeutics", 10ª edición. HARDMAN HG., LIMBIRD LE. editors. McGraw-Hill, New York, y en "Clinical Oncology", 3ª edición. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. editor. En concreto, agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso de acuerdo con la invención incluyen, entre otros, paclitaxeles unidos a nanopartículas de albúmina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "régimen radioterapéutico" o "radioterapia" hace referencia a la administración de radiación para matar células cancerosas. La radiación interacciona con diversas moléculas dentro de la célula, pero el objetivo primario, que da lugar a la muerte celular, es el ácido desoxirribonucleico (ADN). No obstante, la radioterapia a menudo también tiene como resultado daños en las membranas celulares y nucleares y otros orgánulos. Los daños en el ADN normalmente implican roturas en una o las dos hebras en la estructura de azúcar-fosfato. Además puede haber una reticulación de ADN y de proteínas que puede alterar la función celular.

Dependiendo del tipo de radiación, el mecanismo de daños en el ADN puede variar como lo hace la eficacia biológica relativa. Por ejemplo, las partículas pesadas (es decir, protones, neutrones) dañan el ADN directamente y tienen una eficacia biológica relativa mayor. La radiación electromagnética tiene como resultado ionización indirecta que actúa a través de radicales de hidroxilo libres de vida corta producidos principalmente mediante la ionización de agua celular. Las aplicaciones clínicas de la radiación consisten en radiación con haz externo (desde una fuente externa) y braquiterapia (usando una fuente de radiación implantada o insertada en el paciente). La radiación con haz externo consiste en rayos X y/o rayos gamma, mientras que la braquiterapia emplea núcleos radioactivos que se descomponen y emiten partículas alfa o partículas beta junto con un rayo gamma.

La radioterapia puede además usarse en quimioterapia de combinación con el agente quimioterapéutico que actúa como radiosensibilizante. Un experto en la técnica puede determinar la elección específica de la radioterapia adaptada a un paciente individual en el punto de atención, teniendo en cuenta el tejido y el estadio del cáncer. Ejemplos e abordajes radioterapéuticos para varios cánceres se pueden encontrar en, por ejemplo, "Clinical Oncology", 3ª edición. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. editor.

Como se usa en el presente documento, la expresión "régimen terapéutico alternativo" o "tratamiento alternativo" puede incluir, por ejemplo, modificadores de la respuesta biológica (incluidos modificadores de la respuesta biológica, polipéptidos, hidratos de carbono y lípidos), toxinas, lectinas, agentes antiangiogénicos, inhibidores de la tirosina quinasa receptora (por ejemplo Iressa™ (gefitinib), Tarceva™ (erlotinib), Erbitux™ (cetuximab), mesilato de imatinib (Gleevec™), inhibidores del proteosoma (por ejemplo, bortezomib, Velcade™); inhibidores de VEGFR2 tales como PTK787 (ZK222584), inhibidores de la aurora quinasa (por ejemplo, ZM447439); inhibidores de la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR), inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), inhibidores de la rapamicina (por ejemplo, sirolimus, Rapamune™); inhibidores de la farnesiltransferasa (por ejemplo, tipifamib, Zarnestra); inhibidores de la matriz metaloproteínasa (por ejemplo, BAY 12-9566; tecogalan polisacárido sulfatado); inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, Avastin™ (bevacizumab); análogos de la fumagilina tales como TNP-4; carboxiaminotriazol; BB-94 y BB-2516; talidomida; interleuquina-12; linomida; fragmentos peptídicos; y anticuerpos frente a factores de crecimiento vascular y receptores del factor de crecimiento vascular); inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivados de plaquetas, inhibidores de la proteína quinasa C, inhibidores de la quinasa activada por mitógeno, inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógeno, inhibidores del oncogen transformante del virus del sarcoma de Rous (SRC), inhibidores de la histonadesacetilasa, inhibidores del factor inducible por hipoxia, inhibidores hedgehog e inhibidores de la señalización del TGF-β. Además, se consideraría un agente inmunoterapéutico un régimen terapéutico alternativo. Ejemplos incluyen quimocinas, quimiotaxinas,



citoquinas, interleuquinas o factor tisular. Los agentes inmunoterapéuticos adecuados también incluyen globulina sérica o gamma que contiene anticuerpos preformados; adyuvantes inmunoestimulantes no específicos; inmunoterapia específica activa e inmunoterapia adoptiva. Además, terapias alternativas pueden incluir otras entidades químicas basadas en productos biológicos, tales como polinucleótidos, incluidas moléculas antisentido, polipéptidos, anticuerpos, vectores de terapia génica y similares. Dichas terapéuticas alternativas se pueden administrar solas o en combinación, o en combinación con otros regímenes terapéuticos descritos en el presente documento. Un médico versado en la técnica conocerá nombres y marcas alternativas de estos agentes usados en regímenes terapéuticos alternativos y ejemplos adicionales de agentes usados en regímenes terapéuticos alternativos y sus procedimientos de uso, incluidos los regímenes de dosis y administración. Además, asimismo, una persona experta en la técnica conocerá procedimientos de uso de agentes quimioterapéuticos y otros agentes usados en regímenes terapéuticos alternativos en tratamientos de combinación, incluidos los regímenes de dosis y administración.

En concreto, regímenes terapéuticos alternativos adecuados incluyen, entre otros, anticuerpos frente a moléculas sobre la superficie de las células cancerosas, tales como anticuerpos frente a Her2 (e.g., Trastuzumab), EGF o receptores del EGF, VEGF (p. ej., Bevacizumab) o receptores del VEGF, CD20, y similares. El agente terapéutico puede además comprender cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo que participe en uno o más de la activación del complemento, citotoxicidad mediada por células, inducción de la apoptosis, inducción de la muerte celular y opsonización. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede ser un dominio Fc completo o parcial.

Por “anticuerpos” se quiere decir, sin limitaciones, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. En general, un antígeno diana tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma. Las dianas incluyen células cancerosas u otras células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria.

Las inmunoglobulinas divulgadas en el presente documento pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, que mantienen la actividad biológica deseada. Los “fragmentos de anticuerpos” son, en general, el fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de una cadena y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales a los que se hace referencia en el presente documento incluyen anticuerpos “quiméricos” En los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. Nº 4.816.567). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del viejo mundo o simio) y secuencias de la región constante humana.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “CCDA” hacen referencia a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc ((FcR) (p. ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y, después, producen lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la CCDA, células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad CCDA de una molécula de interés se puede realizar un ensayo in vitro de CCDA (patente de EE.UU. Nº 5.003.621 o patente de EE.UU. Nº 5.821.337). Células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de CCDA de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

Un anticuerpo que "induce muerte celular" es uno que hace que una célula viable se convierta en no viable. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de complemento y de células efectoras inmunitarias para distinguir la muerte inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por tanto, el ensayo para la muerte celular se puede realizar usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunitarias. Para determinar si el anticuerpo puede inducir muerte celular, pérdida de la integridad de la membrana evaluado mediante captación de yoduro de propidio (PI), azul tripán o 7AAD se puede evaluar respecto a las células sin tratar. Los anticuerpos inductores de muerte celular son aquellos que inducen captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce muerte celular programada determinada mediante la unión de la anexina V, fragmentación del ADN, disminución del tamaño celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos).

Como se usa en el presente documento, un "quimiosensibilizante" o "sensibilizante" es un medicamento que puede potenciar el efecto terapéutico de un agente quimioterapéutico, tratamiento de radioterapia o régimen terapéutico alternativo y, por tanto, mejora la eficacia de dicho tratamiento o agente. La sensibilidad o resistencia de una célula tumoral o cancerosa al tratamiento también se puede medir en un animal, tal como un ser humano o un roedor, por ejemplo midiendo el tamaño del tumor, la carga tumoral o la incidencia de metástasis durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 6 meses para un ser humano y aproximadamente 2-4, aproximadamente 3-5, o aproximadamente 4-6 semanas para un ratón. Una composición o un procedimiento de tratamiento puede sensibilizar a una respuesta de una célula tumoral o cancerosa a un tratamiento terapéutico si el incremento de la sensibilidad al tratamiento o la reducción de la resistencia es de aproximadamente un 10 % o más, por ejemplo de aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, o más, hasta aproximadamente por 2, aproximadamente por 3, aproximadamente por 4, aproximadamente por 5, aproximadamente por 10, aproximadamente por 15, aproximadamente por 20 o más, en comparación con la sensibilidad al tratamiento o la resistencia en ausencia de dicha composición o procedimiento. La determinación de la sensibilidad o resistencia a un tratamiento terapéutico es rutinaria en la técnica y dentro de las capacidades de una persona versada en la técnica.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se pueden usar de forma intercambiable y hacen referencia a un compuesto formado por al menos dos residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, por ejemplo isoésteres peptídicos (enlaces peptídicos modificados) que pueden proporcionar al péptido propiedades deseadas adicionales, tales como una mayor semivida. Un péptido puede comprender al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos que comprenden un péptido o proteína descritos en el presente documento también se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Se pueden producir modificaciones en cualquier lugar en un péptido, incluida la estructura peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se entiende que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o varios grados en varios sitios en un péptido dado.

Ejemplos de modificaciones en los péptidos pueden incluir acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. Véase, por ejemplo, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2ª ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 y Wold F, *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pág. 1-12 en *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter y col., *Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors*, Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646 and Rattan et al. (1992), *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, "Ann NY Acad Sci 663: 48-62.

Una secuencia sustancialmente similar es una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de referencia únicamente en una o más sustituciones conservadoras como se ha tratado en el presente documento. Dicha secuencia puede ser, por ejemplo, funcionalmente homóloga a otra secuencia sustancialmente similar. Un experto en la técnica apreciará los aspectos de los aminoácidos individuales en un péptido de la invención que puede estar sustituido.

La similitud y la identidad de la secuencia de aminoácidos se pueden computar mediante, por ejemplo, el uso de los programas BLASTP y TBLASTN que usan el algoritmo BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica) 2.0. Las técnicas para computar la similitud o la identidad de la secuencia de aminoácidos son bien conocidas para los expertos en la técnica y el uso del algoritmo BLAST se describe en ALTSCHUL y col., 1990, J Mol. Biol. 215: 403-410 y ALTSCHUL y col., (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Las secuencias sobre las que realizar una alineación se pueden obtener de numerosas bases de datos. Ejemplos de bases de datos de proteínas incluyen SWISS-PROT, que también proporcionan un nivel de anotación elevado en relación con la función de una proteína, su estructura de dominios, modificaciones postraduccionales, variantes (Bairoch A. and Apweiler R. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28 (1):45-48; Bairoch A. y Apweiler R. (1997) *J. Mol. Med.* 75(5):312-316; Junker V.L. y col., (1999) *Bioinformatics* 15(12): 1066-1007), TrEMBL un suplemento anotado por ordenador de SWISS-PROT que contiene todas las traducciones de las entradas de la secuencia de nucleótidos de EMBL (Bairoch A. y Apweiler R. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):45-48) y la base de datos nr compara todas las traducciones de CDS no redundantes en GenBank CDS más las secuencias proteicas de otras bases de datos tales como PDB, SwissProt, PIR y PRF.

Las alineaciones de las secuencias proteicas se pueden realizar usando los algoritmos existentes para buscar en bases de datos secuencias similares a una secuencia de consulta. Un procedimiento de alineación es el algoritmo de Smith-Waterman (Smith, T. F. and Waterman, M.S. 1981. *Journal of Molecular Biology* 147(1):195-197), que es útil en la determinación de cómo se puede producir una alineación óptima entre la secuencia consulta y una secuencia de la base de datos. Dicha alineación se obtiene determinando qué transformaciones necesitaría la secuencia consulta para relacionar con la secuencia de la base de datos. Las transformaciones incluyen sustituir un carácter por otro e insertar o eliminar una tira de caracteres. Se asigna una puntuación para cada puntuación carácter-carácter de comparación positiva para coincidencias exactas y algunas sustituciones, puntuaciones negativas para otras sustituciones e inserciones/delecciones. Las puntuaciones se obtienen a partir de matrices de puntuación derivadas estadísticamente. La combinación de transformaciones que tiene como resultado la puntuación más alta se usa para generar una alineación entre la secuencia consulta y la secuencia de la base de datos. El algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman, S. B. and Wunsch, C.D. 1970, *Journal of Molecular Biology* 48(3):443-453) es similar al algoritmo de Smith-Waterman, pero las comparaciones de secuencias son globales, no locales. Las comparaciones globales fuerzan una alineación de la secuencia consulta completa contra la totalidad de la secuencia de la base de datos. Aunque las alineaciones locales siempre comienzan y terminan con una coincidencia, las alineaciones globales pueden comenzar o terminar con una inserción o delección (indel). Para una secuencia consulta dada y una secuencia de base de datos, una puntuación global será menor o igual a una puntuación local debido a los indel en los extremos. Como alternativa a los algoritmos anteriores se podría usar una búsqueda de Hidden Markov Model (HMM) (Eddy, S. R. 1996. *Current Opinion in Structural Biology* 6(3):361-365) para generar alineaciones de la secuencia de proteínas. La puntuación de HMM sopesa la probabilidad de una coincidencia seguida por inserciones/delecciones o al contrario. Además, los HMM permiten transiciones de inserción a delección (y al contrario) y la puntuación de comenzar y terminar indican controlar si una búsqueda se realiza global o localmente.

Se puede usar uno o más de los algoritmos anteriores en un programa de alineación para generar alineaciones de la secuencia de proteínas. Un experto en la técnica tiene numerosos programas de alineación de la secuencia en los que escoger que incorporan diversos algoritmos diferentes. Un ejemplo de un programa de alineación es BLASTP (Altschul, S.F., y col., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402). Otros programas de alineación son CLUSTAL W y PILEUP. El resultado estándar de un ciclo de BLASTP contiene información suficiente para realizar otros análisis indel como se describe más adelante,

Los aminoácidos se pueden describir como, por ejemplo, polares, apolares, ácidos, básicos, aromáticos o neutros. Un aminoácido polar es un aminoácido que puede interactuar con agua mediante puentes de hidrógeno a pH biológico o casi neutro. La polaridad de un aminoácido es un indicador del grado de puentes de hidrógeno a pH biológico o casi neutro. Ejemplos de aminoácidos polares incluyen prolina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina, lisina, histidina, arginina, aspartato, tirosina y glutamato. Ejemplos de aminoácidos no polares incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, y triptófano. Los aminoácidos ácidos tienen una carga neta negativa a pH neutro. Ejemplos de aminoácidos ácidos incluyen aspartato y glutamato. Los aminoácidos básicos tienen una carga meta positiva a pH neutro. Ejemplos de aminoácidos básicos incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos aromáticos son, en general, apolares y pueden participar en interacciones hidrófobas. Ejemplos de aminoácidos aromáticos incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano. La tirosina puede también participar en los puentes de hidrógeno a través del grupo hidroxilo sobre la cadena lateral aromática. En general, los aminoácidos alifáticos neutros son apolares e hidrofóbicos. Ejemplos de aminoácidos neutros incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina. Un aminoácido se puede describir en más de una categoría descriptiva. Los aminoácidos que comparten una categoría descriptiva común pueden ser sustituibles entre sí en un péptido.

La nomenclatura usada para describir los compuestos peptídicos de la presente invención sigue la práctica convencional en la que el grupo amino se presenta a la izquierda y el grupo carboxi a la derecha de cada residuo aminoácido. En las secuencias que representan realizaciones específicas seleccionadas de la presente invención, los grupos amino y carboxi terminales, aunque no se muestran específicamente, se entenderá que están en la forma que asumirían a valores de pH fisiológico, a menos que se especifique lo contrario.

En las fórmulas de la estructura de los aminoácidos, cada residuo puede representarse, en general, con una designación de una letra o de tres letras, correspondiente al nombre trivial del aminoácido de acuerdo con la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1 Nomenclatura y abreviaturas de los 20 aminoácidos-L convencionales que normalmente se encuentran en los péptidos naturales.**

Nombre completo	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	h
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asp	N
Prolina	Pro	p
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	T

5 El índice de hidropatía de un aminoácido es una escala que indica la tendencia de un aminoácido para buscar un entorno acuoso (valor negativo) o un entorno hidrófobo (valor positivo) (KYTE & DOOLITTLE 1982. J Mol Biol 157:105-132). Los índices de hidropatía de los aminoácidos convencionales incluyen alanina (1,8); arginina (-4,5), asparagina (3,5), ácido aspártico (-3,5), cisteína (2,5), glutamina (-3,5), ácido glutámico (-3,5), glicina (-0,4), histidina (-3,2), isoleucina (4,5), leucina (3,8), lisina (-3,9), metionina (1,9), fenilalanina (2,8), prolina (-1,6), serina (-0,8), treonina (-0,7); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3) y valina (4,2). Los aminoácidos con índices de hidropatía similares  
10 pueden ser sustituibles entres sí en un péptido.

Los aminoácidos que comprenden los péptidos descritos en el presente documento se entenderá que están en la forma L o D. En péptidos y peptidomiméticos de la presente invención, los aminoácidos D pueden ser sustituibles por aminoácidos L.

15 Los aminoácidos contenidos dentro de los péptidos de la presente invención, y en particular en el extremo carboxi o amino, se pueden modificar mediante mutilación, amidación, acetilación o sustitución con otros grupos químicos que pueden modificar la semivida circulante del péptido sin afectar de forma adversa a su actividad biológica. Adicionalmente puede haber o no un puente disulfuro en los péptidos de la invención.

20 Los aminoácidos no convencionales pueden estar en la naturaleza y pueden o no estar genéticamente codificados. Ejemplos de aminoácidos no convencionales codificados genéticamente incluyen selenocisteína, en ocasiones incorporada en algunas proteínas en un codón UGA, que normalmente puede ser un codón de terminación, o pirrolisina, en ocasiones incorporada en algunas proteínas en un codón UAG, que normalmente puede ser un codón de terminación. Algunos aminoácidos no convencionales que no están codificados genéticamente pueden ser el resultado de la modificación de aminoácidos convencionales ya incorporados en un péptido o pueden ser  
25 intermedios metabólicos o precursores, por ejemplo. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 6-N-metililisina, gamma-carboxiglutamato, desmosina, selenocisteína, ornitina, citrulina, iantonina, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, ácido gamma-aminobutírico, carnitina, sarcosina o N-formilmetionina. También se conocen variantes sintéticas de aminoácidos convencionales y no convencionales y pueden incluir aminoácidos derivados químicamente, aminoácidos marcados para identificación y seguimiento o aminoácidos con diversos grupos laterales sobre el carbono alfa. Ejemplos de dichos grupos laterales se conocen en  
30 la técnica y pueden incluir cadenas laterales alifáticas, aromáticas sencillas, aromáticas policíclicas, heterocíclicas, heteronucleares, amino, alquilamino, carboxilo, carboxamida, carboxiléster, guanidina, amidina, hidroxilo, alcoxi, o que contienen mercapto, alquilmercapto u otros heteroátomos. Otros aminoácidos sintéticos pueden incluir alfa-iminoácidos, aminoácidos no alfa, tales como beta-aminoácidos, descarboxi o desaminoácidos. Variantes sintéticos de aminoácidos pueden sintetizarse usando procedimientos generales conocidos en la técnica o se pueden adquirir

de suministradores comerciales, por ejemplo RSP Amino Acids LLC (Shirley, MA).

Con el fin de ejemplificar lo que se quiere decir una sustitución de aminoácido conservador, más adelante se enumeran los grupos A-F. La sustitución de un miembro de los grupos siguientes por otro miembro del mismo grupo se considera una sustitución conservadora.

- 5 El grupo A incluye leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, serina, cisteína, treonina y aminoácidos modificados que tienen las siguientes cadenas laterales: etilo, isobutilo,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$  y  $\text{CH}_2\text{SCH}_3$ .

El grupo B incluye glicina, alanina, valina, serina, cisteína, treonina y un aminoácido modificado que tiene una cadena lateral etilo.

- 10 El grupo C incluye fenilalanina, fenilglicina, tirosina, triptófano, ciclohexilmetilo y residuos de aminoácidos modificados que tienen cadenas laterales de bencilo o fenilo sustituidas.

- El grupo D incluye ácido glutámico, ácido aspártico, un éster alifático, aromático o bencílico sustituido o no sustituido de ácido glutámico o aspártico (p. ej., metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclohexilo, bencilo o bencilo sustituido), glutamina, asparagina, glutamina alquilada-CO-NH o asparagina (p. ej., metilo, etilo, n-propilo e isopropilo) y  
15 aminoácidos modificados que tienen la cadena lateral  $-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ , un éster de los mismos (éster alifático, aromático o bencílico sustituido o no sustituido), una amida del mismo y una amida N-alquilada sustituida o no sustituida del mismo.

El grupo E incluye histidina, lisina, arginina, N-nitroarginina, p-cicloarginina, g-hidroxiarginina, N-amidinocitrulina, ácido 2-amino-guanidinobutanoico, homólogos de lisina, homólogos de arginina y ornitina.

- 20 EL grupo F incluye serina, treonina, cisteína y aminoácidos modificados que tienen cadenas laterales de alquilo lineales o ramificadas de C1-C5 sustituidas con  $-\text{OH}$  o  $-\text{SH}$ .

Los grupos A-F son ejemplos y no se pretende que limiten la invención.

- Un peptidomimético es un compuesto que comprende elementos estructurales no peptídicos que imitan la acción biológica de un péptido parental. Un peptidomimético puede no tener las características clásicas de un péptido, como un enlace peptídico que se puede escindir enzimáticamente. Un péptido parental puede identificarse inicialmente como una secuencia de unión o un sitio de fosforilación sobre una proteína de interés o puede ser un péptido natural, por ejemplo una hormona peptídica. Los ensayos para identificar peptidomiméticos pueden incluir un péptido parental como control positivo con fines comparativos, al realizar una detección selectiva en una biblioteca, tal como una biblioteca peptidomimética. Una biblioteca peptidomimética es una biblioteca de compuestos que  
25 pueden tener una actividad biológica similar a la de un péptido parental.

- Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" incluye ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, las hebras tanto sentido como antisentido, y pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o  
35 más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces sin carga (p. ej., fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos etc.), enlaces cargados (p. ej. fosforotioatos, fosforoditioatos etc.), restos pendientes (p. ej., polipéptidos) y enlaces modificados (p. ej., polinucleótidos anoméricos alfa etc.). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada mediante puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas.

- 40 "Ácidos nucleicos peptídicos" (PNA) como se usan en el presente documento hacen referencia a ácidos nucleicos modificados en los que el esqueleto de azúcar fosfato de un ácido nucleico se ha convertido en un esqueleto de N-(2-aminoetil)-glicina. Aunque los esqueletos de azúcar-fosfato del ADN/ARN se someten a una carga negativa en condiciones neutras que tiene como resultado una repulsión electrostática entre cadenas complementarias, la estructura básica del PNA no tiene una carga inherente. Por tanto, no existe repulsión electrostática. En consecuencia, el PNA tiene una mayor capacidad para formar dobles cadenas en comparación con los ácidos nucleicos convencionales y tiene una capacidad elevada para reconocer las secuencias de bases. Además, los PNA son, generalmente, más sólidos que los ácidos nucleicos. Los PNA también se pueden usar en matrices y en otras reacciones de hibridación o de otro tipo como se ha descrito anteriormente y en el presente documento para los oligonucleótidos.

- 50 Como se usa en el presente documento, el término "vector" hace referencia a un compuesto polinucleotídico usado para introducir polinucleótidos exógenos o endógenos en las células huésped. Un vector comprende una secuencia de nucleótidos que puede codificar una o más moléculas polipeptídicas. Plásmidos, cósmicos, virus y bacteriófagos, en un estado natural o que han sufrido ingeniería recombinante, son ejemplos no limitantes de vectores de uso habitual para proporcionar vectores recombinantes que comprenden al menos una molécula polinucleotídica aislada deseada.  
55

Como se usa en el presente documento, un "supresor tumoral" es un gen o producto génico que tiene un papel

biológico normal de restricción del crecimiento no regulado de una célula. Si la función de un supresor tumoral se pierde surge un crecimiento celular mal regulado. El homólogo funcional de un supresor tumoral es un oncogenes que estimulan el crecimiento celular normal se puede conocer como "protooncogenes". Una mutación que activa este gen o producto génico convierte además en un "oncogén", que continua la actividad de crecimiento celular pero de un modo mal regulado. Ejemplos de genes y productos génicos supresores tumorales se conocen bien en la literatura y pueden incluir PTC, BRCA1, BRCA2, p16, APC, RB, WT1, EXT1, p53, NF1, TSC2, NF2, VHL o SPARC. Otros ejemplos de genes supresores tumorales, productos génicos y sus funciones se pueden encontrar en; McKusick, V.A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12ª edición), y el el sitio online adjunto: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) y National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

La presente descripción proporciona además constructos de ácidos nucleicos que comprenden elementos de control y una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento unida operativamente a los elementos de control (p, ej., un promotor adecuado) para la expresión de un polipéptido o un polipéptido descrito en el presente documento. La expresión de proteínas depende del nivel de transcripción de ARN, que a su vez está regulado por señales del ADN. De un modo similar, la traducción del ARNm requiere, como mínimo, un codón de iniciación del AUG, que normalmente se localiza dentro de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos desde el extremo 5' del mensaje. Se ha demostrado que las secuencias flanqueantes del codón iniciador AUG afectan a su reconocimiento por los ribosomas eucariotas conforme a una secuencia consenso perfecta de Kozak, que tiene como resultado una traducción óptima (véase, por ejemplo, Kozak, J. Molec. Biol. 196: 947-950 (1987)). Asimismo, el éxito de la expresión de un ácido nucleico exógeno en una célula puede requerir la modificación postraducciona de una proteína resultante. De acuerdo con esto, la invención proporciona plásmidos que codifican polipéptidos en los que el vector es, por ejemplo, pCDNA3.1 o un derivado del mismo.

Las moléculas de ácido nucleico descritos en el presente documento comprenden, preferentemente, una región de codificación unida operativamente a un promotor adecuado, en el que el promotor es, preferentemente, funcional en las células eucariotas. En la invención se pueden usar promotores virales, tales como, entre otros, el promotor del RSV y el promotor tardío mayor del adenovirus se. Promotores no virales adecuados incluyen, entre otros, el promotor de la fosfoglicerocinasa (PGK) y el promotor del factor 1 $\alpha$  de elongación. Deseablemente, los promotores no virales son promotores humanos. Elementos genéticos adicionales adecuados, muchos de los cuales se conocen en la técnica, también pueden estar ligados a, unidos a o insertados en el ácido nucleico y constructos de la invención para proporcionar funciones, nivel de expresión o patrón de expresión adicionales. Los promotores nativos para la expresión de los genes de la familia SPARC también se pueden usar, en cuyo caso preferentemente no se usan en el cromosoma que los codifica de forma natural a menos que estén modificados por un procedimiento que cambie sustancialmente dicho cromosoma. Dichos cromosomas modificados sustancialmente pueden incluir cromosomas transfectados y alterados por un vector retroviral o un procedimiento similar. Como alternativo, dichos cromosomas modificados sustancialmente pueden comprender un cromosoma artificial tal como HAC, YAC o BAC.

Además, las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden estar unidas operativamente a potenciadores para facilitar la transcripción. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis y estimulan la transcripción de los genes adyacentes. Ejemplos de potenciadores que confieren un nivel elevado de transcripción sobre los genes unidos en una serie de tipos de células diferentes de muchas especies incluyen, entre otros, los potenciadores de SV40 y el RSV-LTR. Dichos potenciadores se pueden combinar con otros potenciadores que tengan efectos específicos del tipo de célula o cualquier potenciador se puede usar solo.

Para optimizar la producción de proteínas, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender además un sitio de poliadenilación tras la región de codificación de la molécula de ácido nucleico. Asimismo, preferentemente, todas las señales de la transcripción adecuadas (y, cuando sea adecuado, las señales de traducción) se dispondrán de forma correcta de un modo tal que el ácido nucleico exógeno se exprese adecuadamente en las células en las que se introduce. Si se desea, el ácido nucleico exógeno también puede incorporar sitios de corte y empalme (es decir, sitios donantes de corte y empalme y aceptores de corte y empalme) para facilitar la producción de ARNm al tiempo que se mantiene un transcrito de longitud completa dentro del marco. Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender además las secuencias adecuadas para procesamiento, secreción, localización intracelular y similares.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden insertar en cualquier vector adecuado. Vectores adecuados incluyen, sin limitaciones, vectores virales. Vectores virales adecuados incluyen, sin limitaciones, vectores retrovirales, vectores de alfavirus, vacunales, adenovirales, virales adenoasociados y virales de la viruela aviar. Preferentemente, los vectores tienen una capacidad nativa o sintética para transformar células eucariotas, por ejemplo células CHO-K1. Adicionalmente, los vectores útiles en el contexto de la invención pueden ser vectores de ácido nucleico "desnudos" (es decir, vectores que tienen pocas o ninguna proteína, azúcares y/o lípidos encapsulándolos), tales como plásmidos o epitomas, o los vectores pueden estar formando complejos con otras moléculas. Otras moléculas que se pueden combinar adecuadamente con los ácidos nucleicos de la invención incluyen, entre otras, cubiertas virales, lípidos catiónicos, liposomas, poliaminas, partículas de oro y restos dirigidos tales como ligandos, receptores o anticuerpos dirigidos a moléculas celulares.

Una medida de "correspondencia" de los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas para su uso en el presente documento con referencia a los ácidos nucleicos y proteínas descritos en lo que antecede es la "identidad" relativa entre secuencias. En el caso de los péptidos o proteínas o en el caso de los ácidos nucleicos definidos de acuerdo con una correspondencia de péptido o proteína codificado incluye un péptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 50 %, como alternativa una identidad de al menos aproximadamente un 70 %, como alternativa una identidad de al menos aproximadamente un 90 % o incluso de aproximadamente un 95 % y también pueden tener una identidad de al menos aproximadamente un 98-99 % con un péptido o proteína especificado. Medidas preferidas de la identidad como entre ácidos nucleicos son las mismas que se especifican en lo que antecede para péptidos con una identidad de al menos aproximadamente un 90 %, siendo la más preferida una identidad de al menos aproximadamente 98-99 %.

El término "identidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la medida de la identidad de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La identidad se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a efectos de comparación. Dos secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico se consideran sustancialmente idénticas si comparten una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75 %, preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 90 % o incluso más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95 % y, lo más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 98-99 %.

La identidad de secuencia se puede determinar mediante el algoritmo BLAST actualmente en uso y que se describió inicialmente en Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El algoritmo BLAST se puede usar con los parámetros predeterminados publicados. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, se considera que las moléculas comparten identidad en dicha posición. El grado de identidad entre secuencias es función del número de posiciones coincidentes compartidas por las secuencias.

Una medida alternativa de la identidad de las secuencias de ácido nucleico es determinar si dos secuencias hibridan entre sí en condiciones de rigurosidad baja y, preferentemente, de rigurosidad alta. Dichas secuencias son sustancialmente idénticas cuando hibridan en condiciones de rigurosidad alta. La hibridación con secuencias unidas a un filtro en condiciones de rigurosidad baja puede realizarse en, por ejemplo,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M, 7 % de dodecilsulfato sódico (SDS), EDTA 1 mM a 65 °C y lavados en 0,2 x SSC/0,1 SDS a 42 °C (véase Ausubel y col., (eds.) 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & sons, Inc., New York, en la pág. 2.10,3). Como alternativa, la hibridación con secuencias unidas a un filtro en condiciones de rigurosidad alta puede realizarse en, por ejemplo,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M, 7 % de SDS, EDTA 1 mM a 65 °C y lavados en 0,2 x SSC/0,1 SDS a 68 °C (véase Ausubel y col., (eds.) 1989, ant.).

Las condiciones de hibridación se pueden modificar de acuerdo con procedimientos conocidos en función de la secuencia de interés (véase Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology --Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 "Overview of Principles in Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Probe Assays", Elsevier, New York). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5 °C menos que el punto de fusión térmica para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos.

La proteína SPARC de longitud completa tiene múltiples dominios funcionales, incluidos un dominio ácido en el extremo N, un dominio de tipo folistatina que puede inhibir la proliferación y un dominio extracelular en el extremo C que se une a iones de calcio con una afinidad elevada e inhibe la proliferación celular. Cuando la proteína SPARC de longitud completa se administra a un modelo tumoral de ratón, se ha demostrado actividad de quimiosensibilización, lo que mejora la tasa de respuesta de los tumores resistentes a agentes quimioterapéuticos, por ejemplo 5-fluorouracilo, irinotecán, cisplatino o etoposido.

Todavía no se ha investigado cuál de estos dominios, o regiones dentro de estos dominios, es responsable de los efectos mediadores de la apoptosis o quimiosensibilizantes de la SPARC.

Un experto en la técnica apreciará que las designaciones numéricas de las posiciones de las mutaciones dentro de una secuencia son relativas a la secuencia específica. Asimismo, a las mismas posiciones se les puede asignar diferentes designaciones numéricas en función del modo en el cual la secuencia se numera y se escoge la secuencia. Además, las variaciones de secuencia, como inserciones o deleciones, pueden cambiar la posición relativa y, después, las designaciones numéricas de determinados nucleótidos en y alrededor de un sitio mutacional.

La SEC ID N° 1 (N\_003118) es la secuencia de ADNc de longitud completa que codifica la proteína SPARC. Cuando se traduce se produce la proteína SPARC de 303 aminoácidos (SEC ID N° 10). La SEC ID N° 2 está formada por los nucleótidos 157-309 del ADNc de la SPARC. Estos nucleótidos corresponden al dominio ácido del extremo N de los aminoácidos 17-68 (NT) de la proteína SPARC (SEC ID N° 3). La SEC ID N° 4 está formada por los nucleótidos 310-565 del ADNc de la SPARC. Estos nucleótidos corresponden al dominio de tipo folistatina de los aminoácidos 69-153 (FS) de la proteína SPARC (SEC ID N° 5). La SEC ID N° 6 está formada por los nucleótidos 566-1015 del ADNc de la SPARC. Estos nucleótidos corresponden al dominio extracelular de los aminoácidos 154-303 (EC) de la proteína SPARC (SEC ID N° 7). La SEC ID N° 11 está formada por los nucleótidos 157-225 del ADNc de la SPARC. Estos nucleótidos corresponden al péptido B8 (SEC ID N° 8). La SEC ID N° 12 está formada por los nucleótidos 319-411 del ADNc de la SPARC. Estos nucleótidos corresponden al péptido B14 (SEC ID N° 9). Otras secuencias peptídicas correspondientes a los primeros 17 aminoácidos de la proteína SPARC de longitud completa o los

primeros 17 aminoácidos con residuos aminoácidos adicionales en el extremo N del péptido se identifican del siguiente modo: A (SEC ID N° 13); A1 (SEC ID N° 14); A2 (SEC ID N° 15); y A3 (SEC ID N° 16). Además, los péptidos B8 y B14 estaban mezclados para producir péptidos de control negativo B8-SCR (SEC ID N° 17), y B 14-SCR (SEC ID N° 18).

5 La transfección de vectores que expresan fragmentos de polinucleótidos (SEC ID N° 2 y la SEC ID N° 4) de la SPARC en líneas de células tumorales sensibles y resistentes indicó que la región de tipo folistatina (codificada por la secuencia polinucleotídica SEC ID N° 4, traducida a la secuencia polipeptídica SEC ID N° 5) y la región inmediata en N-terminal, incluida una secuencia señal sin escindir (codificada por la secuencia de polinucleótidos SEC ID N° 2, traducida en la secuencia polipeptídica SEC ID N° 3) son capaces de un modo similar de inducir apoptosis in Vitro  
10 cuando se sometían de forma concomitante a un agente quimioterapéutico (Figuras 1 y 2). La región de tipo folistatina interacciona con un dominio EC para unirse al calcio y puede controlar la homeostasis del calcio, un factor clave en la regulación de la apoptosis. La sobreexpresión de estos polipéptidos puede interferir en las interacciones proteína-proteína que implican proteínas celulares que, en células no cancerosas, pueden interaccionar con SPARC y estimular la apoptosis.

15 La terapia génica es una intervención médica que implica modificar el material genético de las células vivias para combatir enfermedades. La terapia génica se está estudiando en ensayos clínicos (estudios de investigación con seres humanos) para muchos tipos diferentes de cáncer y para otras enfermedades. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido SPARC adecuado para su uso en "terapia génica" (véase, por ejemplo, Patil y col., AAPS J. 7(1):E61-77 (2005)).

20 En general, un gen se suministra a la célula usando un "vector", como el divulgado en el presente documento. Los tipos más frecuentes de vectores usados en terapia génica son virus. Los virus usados como vectores terapia génica están desactivados genéticamente, son incapaces de reproducirse ellos mismos. La mayoría de los ensayos clínicos de terapia génica utilizan retrovirus de ratón para suministrar el gen deseado. Otros virus usados como vectores incluyen adenovirus, virus adenoasociados, virus de viruela y virus del herpes. En la técnica se conocen vectores de  
25 terapia génica viral adecuados y los modos de su administración in vivo y ex vivo.

La terapia génica se puede realizar tanto ex vivo como in vivo. Normalmente, en los ensayos clínicos de terapia génica ex vivo se extraen células de la sangre o médula ósea de los pacientes y se cultivan en el laboratorio. Las células se exponen al virus portador del gen deseado. El virus entra en las células y el gen deseado pasa a formar parte del ADN de las células. Las células se cultivan en el laboratorio y después se devuelven al paciente mediante  
30 inyección en vena. Usando terapia génica in vivo se pueden usar vectores tales como, por ejemplo, virus o liposomas, para suministrar el gen deseado a las células dentro del cuerpo del paciente.

La identificación de secuencias polipeptídicas de SPARC calve implicadas en el control de la apoptosis precede al desarrollo de terapéuticas quimiosensibilizantes a base de péptidos para su uso junto con agentes quimioterapéuticos. Polipéptidos sintéticos individuales que abarcan al menos 5 aminoácidos consecutivos del tercer N-terminal de SPARC, incluida la secuencia señal de secreción escindida en la SPARC inmadura, puede, en  
35 combinación con un agente quimioterapéutico, servir para sensibilizar las células cancerosas en un tumor resistente. Los ensayos para identificar polipéptidos sintéticos adecuados se pueden realizar exponiendo células cancerosas resistentes in vitro o in vivo a al menos un polipéptido aislado y un agente quimioterapéutico (solo o en combinación), seguida de la exposición continuada y a un agente quimioterapéutico, como se ha descrito en el presente documento. La supervivencia y la apoptosis celular se puede evaluar usando procedimientos descritos en el presente documento.

Los péptidos de acuerdo con una realización pueden incluir péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la Tabla 2. Otros péptidos de acuerdo con otras realizaciones de la invención pueden incluir péptidos que tienen una secuencia sustancialmente similar a las proporcionadas en la Tabla 2. Dichos  
45 péptidos pueden estar aislados o pueden estar unidos a, o en combinación con, compuestos trazadores, secuencias de translocación proteica, liposomas, portadores de hidratos de carbono, portadores poliméricos u otros agentes o excipientes, como será evidente para los expertos en la técnica. En una realización alternativa, dichos péptidos pueden comprender un medicamento, en el que dichos péptidos pueden estar presentes en una cantidad farmacológicamente eficaz.

50 La presente invención proporciona composiciones para sensibilizar a tratamientos terapéuticos para el cáncer. Dichas composiciones y procedimientos sensibilizantes son particularmente útiles en la potenciación de la respuesta de los pacientes resistentes a un tratamiento. También son útiles en la reducción de los efectos secundarios del tratamiento del cáncer, por ejemplo potenciando la respuesta de un paciente a una concentración (es decir, dosis) menor del tratamiento. La composición de la presente invención puede reducir la dosis de un agente de tratamiento  
55 terapéutico en al menos aproximadamente un 10 %, por ejemplo al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % y al menos aproximadamente un 60 %.



TABLA 3. Secuencias de péptidos

SEC ID Nº	Nombre del péptido*	Secuencia de aminoácidos (de N a C)	Quimiosensibilizante (S/N)
3	NT	APQQEALPDETEVVEETVAEVTESVVGANPVQVEVGEFDDGAEETEEEVVA	S
5	FS	ENPCQNHCKHKGKVCELDENNTPMCVCDPTSCPAIGEFKVCSDNKTFTDSSCHFFATKCTLEGTKKGHKLHLDYIGPCKYIP	S
7	EC	CLDSELTEFPLMRDWLKNVLVTLYERDEDNNLLTEKQKLRVKKIHENEKRLEAGDHPVELLARDFEKNYNMYIFPVHWQFGQLDQHPIDGYLSHTELAPLRAPLIPMEHCTTRFFETCDLDNDKYIALDEWAGCFGIKQKDIDKDLVI	S
8	B8	APQQEALPDETEVVEETVAEVE	S
9	B14	CQNHCKHKGKVCELDENNTPMCVCDPTSCP	S
13	A	ESALCLPPACPLRPSTMRWIFFLLCLAGRALA	N
14	A1	MRAWIFFLLCLAGRALA	N
15	A2	ACLPLRPSTMRWIFFLLCLAGRALA	N
16	A3	CLPPACPLRPSTMRWIFFLLCLAGRALA	N
17	B8-SCR	QPLEAVQPTAVEEDAETEEV	N
18	B14-SCR	VPCKTGSKCHNNDPPTCNCEVDMCLQHCEH	N
SCR = péptido <i>manipulado</i>			

Los expertos en la técnica reconocerán que, dada la universalidad del código genético, conocer una secuencia de aminoácidos dada permite a los expertos en la técnica concebir fácilmente un número finito de secuencias polinucleotídicas específicas que pueden codificar un polipéptido de dicha secuencia de aminoácidos. Además, el experto en la técnica puede determinar fácilmente la secuencia polinucleotídica óptima para codificar un polipéptido de dicha secuencia de aminoácidos para la expresión en cualquier especie dada mediante el procedimiento de "optimización por codón", que es bien conocido en la técnica (vase, por ejemplo, VILLALOBOS y col.; Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. BMC Bioinformatics. 2006 Jun 6;7:285).

La presente invención proporciona, en una realización, una composición que comprende un polipéptido SPARC y una célula resistente a quimioterapia. Además de sensibilizar una muestra o un mamífero a un tratamiento para el cáncer, el uso de las composiciones sujeto de la presente invención puede reducir la dosis de un tratamiento, reduciendo así los efectos secundarios causados por tratamiento para el cáncer. Las composiciones anteriores pueden comprender una composición farmacéutica que además incluye un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, un "transportador" se refiere a cualquier sustancia adecuada como vehículo para suministrar un ingrediente farmacéutico activo (IFA) en un sitio de acción in vitro o in vivo adecuado. Como tales, los transportadores pueden actuar como excipientes para formulación de un reactivo terapéutico o experimental que contiene un IFA. Los transportadores preferidos son capaces de mantener un IFA en una forma que sea capaz de interactuar con un linfocito T. Ejemplos de dichos transportadores incluyen, entre otros agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank y otras soluciones acuosas fisiológicamente equilibradas o medios de cultivo celular. Los transportadores acuosos PUEDEN también contener sustancias auxiliares adecuadas requeridas para aproximar las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo potenciación de la estabilidad química y la isotonicidad. Sustancias auxiliares adecuadas incluyen, entre otras, acetato sódico, cloruro sódico, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris y tampón bicarbonato.

#### Procedimientos

#### Clonación y construcción de plásmidos

Los fragmentos polinucleotídicos correspondientes a las SEC ID Nº 2, la SEC ID Nº 4 o la SEC ID Nº 6 se

amplificaron mediante PCR y se insertaron en el vector pSecTag (Invitrogen), y se verificaron mediante secuenciación.

### Cultivo celular y mantenimiento

5 Las líneas de células colorrectales MIP101 y células MIP/CPT se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementadas con 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen), 1 % de penicilina/estreptomycina FBS) (Invitrogen) a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### Desarrollo de líneas celulares resistentes

10 Las células MIP101 resistentes se desarrollaron tras incubación prolongada con concentraciones crecientes de 5-fluorouracilo (5-FU) (10-500 uM), irinotecán (CPT) (1-50 uM; Pharmacia), cisplatino (CIS) (1-100 uM) o etopósido (ETO) (0,1-5 uM: Sigma Aldrich). La concentración de cada agente se aumentó un 10 % cada 2 semanas durante un periodo de 6 meses.

### Transfección transitoria

15 Se realizaron transfecciones transitorias como se ha descrito anteriormente (Tai TC y col., 2001. J Neurochem;76:1851-9) Brevemente, las células colorrectales MIP 101 y células MIP/CPT resistentes se cultivaron hasta un 50-60 % de confluencia en placas de cultivo tisular de 96 pocillos se transfectaron con 1,0 mg del vector (control) o vector + fragmentos de SPARC usando transfección PEI (Tai, T.C. y col., 2002. Mol Pharmacol 61:1385-92). Tras la transfección, las células se lavaron con medio DMEM (suplementado con 10 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomycina) y se incubaron en medio fresco durante 48 horas antes de incubarse con agentes quimioterapéuticos (5-FU 1000 µM o CPT-11 500 µM) durante 24 horas. La proliferación celular se evaluó mediante ensayo MTS (Promega).

### Ensayos con péptidos

25 Células MIP 101 sensibles y MIP/5FU resistentes se sembraron a una densidad de 8.000 células/pocillo (placa de 96 pocillos) en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomycina. Tras incubarse a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, se extrajo el medio y se añadió medio nuevo acondicionado sin suero (VP-SFM, Invitrogen) que contiene el péptido de interés y se incubó durante 48 horas adicionales en presencia o ausencia de 5-FU 500 µM. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo MTS.

30 Los péptidos se sintetizaron adaptados en Sigma. Los péptidos A, A1, A2, A3 se disolvieron en DMSO al 0,1 %. Los péptidos B8, B 14, B8-*manipulado* y B 14-*manipulado* se disolvieron en PBS. Para el ensayo de viabilidad celular con MTS se obtuvo una curva de respuesta a la dosis usando una concentración del péptido "alta" de 200 µg/ml y una concentración del péptido "baja" de 96 µg/ml.

### Viabilidad celular (ensayo MTS)

35 Para el ensayo MTS, la sal interna de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenol)-2-(4-sulfonil)2H-tetrazolio (MTS) y metosulfato de fenazina (PMS), adquiridos en Promega (Madison, WI), se mezclaron en las proporciones 2:0,92 µg/ml y 25 µl de la mezcla se añadieron a cada pocillo. Después de incubarse a 37 °C con 5 % DE CO<sub>2</sub> durante 2 horas, la absorbancia de cada pocillo a 490 nm se midió en un lector de placas de 96 pocillos (Versa Max, version 4.8, Molecular Devices Co.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje del control.

La significación estadística entre cada grupo se determinó usando un análisis de la varianza, seguido de una comparación post hoc con una prueba t de Student. Un valor de P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

45 Células sensibles (MIP101 -Figura 1) y resistentes a múltiples fármacos (MIP/CPT -Figura 2) se transfectaron transitoriamente y se analizó la supervivencia tras la exposición a irinotecán (CPT). La viabilidad celular se cuantificó mediante un ensayo MTS. La transfección de las SEC ID N° 2 y la SEC ID N° 4 tuvo un efecto similar al disminuir la viabilidad celular en las células MIP/CPT resistentes en comparación con la del vector SPARC de longitud completa. Las células MIP/CPT resistentes transfectadas con control (vector vacío) permanecieron viables a pesar de la exposición a CPT-11 500 µM.

#### Ejemplo 2

#### Uso de quimiosensibilizantes péptidos SPARC in vitro

50 Este ejemplo demuestra la utilidad de los quimiosensibilizantes peptídicos de SPARC de la invención en un sistema de modelo in vitro.

Se sintetizaron péptidos más cortos correspondientes a varias regiones de la región ácida del extremo N o del dominio de folistatina para estrechar más las secuencias peptídicas con actividad quimiosensibilizante.

Las células MIP101 sensibles o resistentes a 5-FU (MIP/5FU) se expusieron al péptido B14 (SEC ID N° 9) como se ha descrito. En ambas células, tanto sensibles como resistentes, el péptido solo, a cualquiera de las concentraciones analizadas, no afectó de forma significativa a la viabilidad (Figura 4). Como cabía esperar, las células resistentes exhibieron mayor viabilidad en presencia de 5-FU solo, con la adición del péptido B14 a 96 o 200 µg/ml, la viabilidad celular disminuyó en comparación con el 5-FU solo, lo que indica que la presencia del péptido disminuye la sensibilidad de las células resistentes al agente quimioterapéutico.

Se observa una tendencia similar cuando las células MIP101 sensibles o resistentes a 5-FU (MIP/5FU) se expusieron al péptido B8 (SEC ID N° 8) (Figura 3). El péptido solo, a cualquier concentración, no afectó a la viabilidad celular. En las células resistentes (MIP/5FU), el fármaco por sí mismo no tuvo efecto sobre la viabilidad celular, pero en presencia de concentraciones crecientes del péptido se produjo una sensibilidad creciente de las células resistentes al agente quimioterapéutico.

Como control, las células MIP101 sensibles y resistentes a 5-FU (MIP/5FU) se expusieron a los péptidos A (SEC ID N° 13); A1 (SEC ID N° 14); A2 (SEC ID N° 15); y A3 (SEC ID N° 16) como se muestra en la Figura 5 y a B8-SCR (SEC ID N° 17), y B 14-SCR (SEC ID N° 18) como se muestra en la Figura 6. En ambas células, tanto sensibles como resistentes, el péptido (a concentraciones altas) solo o en combinación con 5-FU no afectó de forma significativa a la viabilidad (Figuras 5 y 6).

### Ejemplo 3

#### Uso de quimiosensibilizantes péptidos SPARC in vivo

Este ejemplo demuestra la utilidad de los quimiosensibilizantes péptidos de SPARC de la invención en un modelo de xenoinjerto tumoral.

Los modelos animales de xenoinjerto tumoral se usaron para evaluar el efecto de la sobreexpresión de diferentes fragmentos de SPARC sobre la progresión tumoral in vivo. Las células MIP 101 con transfección estable y expresión de SPARC (MIP/SP) o diferentes fragmentos biológicos que representan el extremo N ((MIP/NT), los dominios de folistatina (MIP/FS) y extracelular (MIP/EC) de SPARC se usaron para el modelo de xenoinjerto tumoral. En ratones atímicos NIH (de 6 semanas de edad, Taconic Laboratories, Germantown, NY) se implantaron  $1 \times 10^6$  células en el flanco izquierdo. Los regímenes de tratamiento se iniciaron cuando el tamaño medio del tumor alcanzó un volumen de  $75-100 \text{ mm}^3$ . Los tumores se midieron usando un compás manual (Fisher Scientific International, Inc. Hampton, NH) con mediciones simultáneas del peso corporal hasta finalizar el estudio. Se proporcionó quimioterapia usando un régimen de ciclos de 3 semanas (x 6 ciclos en total). Inyecciones intraperitoneales (IP) de 5 -FU a 25 mg/kg de peso corporal tres veces a la semana 1 de cada ciclo, seguido de 2 semanas de periodos sin tratamiento. Los animales control recibieron inyecciones de solución salina. Cada grupo contenía 6-8 animales.

Los resultados se muestran en las Figuras 7-10, las células MIP 101 que expresan de forma estable el extremo N (fragmento NT, SEC ID N° 2) y los dominios extracelular (fragmento EC; SEC ID N° 6) de SPARC demostraron una sensibilización significativa a 5-FU en este sistema de xenotransplante. Específicamente, el fragmento NT parece proporcionar la mayor sensibilidad in vivo, seguido del fragmento EC y, por último, el fragmento FS. El dominio EC muestra un retraso del efecto quimiosensibilizante moderado, que se produce tras aproximadamente 44 días de tratamiento en el presente ensayo.

Aunque se han descrito e ilustrado realizaciones específicas de la invención, dichas realizaciones se deberán considerar únicamente ilustrativas de la invención y no limitantes de la invención.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> The University of British Columbia TAI, Isabella T.

<120> Sensibilizantes a quimioterapéuticos

<130> 80021-1073

<150> 60/816,316

<151> 2006-06-26

<150> WO PCT/CA2007/001150

<151> 2007-06-26

<160> 18

<170> PatentIn versión 3,3

<210> 1

<211> 3178

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gttgccctgtc tctaaacccc tccacattcc cgcggctcctt cagactgccc ggagagcgcg      60
ctctgcctgc cgcctgcctg cctgccactg aggggttccca gcaccatgag ggcctggatc      120
ttctttctcc ttgctgtggc cgggagggcc ttggcagccc ctcagcaaga agccctgcct      180
gatgagacag aggtggtgga agaaactgtg gcagaggtga ctgaggtatc tgtgggagct      240
aatcctgtcc aggtggaagt aggagaattt gatgatggtg cagaggaaac cgaagaggag      300
gtggtggcgg aaaatccctg ccagaaccac cactgcaaac acggcaaggt gtgagagctg      360
gatgagaaca acaccccat gtgcgtgtgc caggaccca ccagctgccc agcccccatt      420
ggcgagtttg agaaggtgtg cagcaatgac aacaagacct tcgactcttc ctgccacttc      480
tttgccacaa agtgcaccct ggagggcacc aagaagggcc acaagctcca cctggactac      540
atcgggcctt gcaaatacat ccccccttgc ctggactctg agctgaccga attccccctg      600
cgcctgcctg actggtctca gaacgtcctg gtcaccctgt atgagaggga tgaggacaac      660
aaccttctga ctgagaagca gaagctgcgg gtgaagaaga tccatgagaa tgagaagcgc      720
ctggaggcag gagaccaccc cgtggagctg ctggcccggg acttcgagaa gaactataac      780
atgtacatct tccctgtaca ctggcagttc ggccagctgg accagcacc cattgacggg      840
tacctctccc acaccgagct ggtccactg cgtgctcccc tcatcccat ggagcattgc      900
accaccgct ttttcgagac ctgtgacctg gacaatgaca agtacatcg cctggatgag      960
tgggccggct gcttcggcat caagcagaag gatatcgaca aggatcttgt gatctaaatc     1020
cactccttcc acagtaccgg attctctctt taaccctccc cttcgtgttt cccccaatgt     1080
ttaaaatgtt tggatggttt gttgttctgc ctggagacaa ggtgctaaca tagatttaag     1140
tgaatacatt aacggtgcta aaaatgaaaa ttctaacca agacatgaca ttcttagctg     1200
taacttaact attaaggcct tttccacacg cattaatagt cccatttttc tcttgccatt     1260

```

tgtagctttg cccattgtct tattggcaca tgggtggaca cggatctgct gggctctgcc 1320  
 ttaaacacac attgcagctt caacttttct ctttagtggt ctgtttgaaa ctaatactta 1380  
 ccgagtcaga ctttgtgttc atttcatttc agggctcttg ctgcctgtgg gcttccccag 1440  
 gtggcctgga ggtgggcaaa ggaagtaac agacacacga tgttgtcaag gatgggtttg 1500  
 ggactagagg ctgagtggtg ggagagatcc ctgcagaacc caccaaccag aacgtgggtt 1560  
 gcctgaggct gtaactgaga gaaagattct ggggctgtgt tatgaaaata tagacattct 1620  
 cacataagcc cagttcatca ccatttcctc ctttaccttt cagtgcagtt tcttttcaca 1680  
 ttaggctggt ggttcaaact tttgggagca cggactgtca gttctctggg aagtggctcag 1740  
 cgcacctctg agggcttctc ctctctgtc ttttgagaa ccagggtctt tctcaggggc 1800  
 tctagggact gccaggctgt ttcagccagg aaggccaaaa tcaagagtga gatgtagaaa 1860  
 gttgtaaaat agaaaaagtg gagttggtga atcggttgtt ctttcctcac atttgatga 1920  
 ttgtcataag gtttttagca tgttcctcct tttcttcacc ctcccctttt tctttctatt 1980  
 aatcaagaga aacttcaaag ttaatgggat ggtcggatct cacaggctga gaactcgttc 2040  
 acctccaagc atttcatgaa aaagctgctt cttattaatc atacaaactc tcaccatgat 2100  
 gtgaagagtt tcacaaatcc ttcaaaataa aaagtaatga cttagaaact gccttcctgg 2160  
 gtgatttgca tgtgtcttag tcttagtcac cttattatcc tgacacaaaa acacatgagc 2220  
 atacatgtct acacatgact acacaaatgc aaacctttgc aaacacatta tgcttttgca 2280  
 cacacacacc tgtacacaca caccggcatg tttatacaca gggagtgtat ggttcctgta 2340  
 agcactaagt tagctgtttt catttaatga cctgtgggtt aaccttttg atcactacca 2400  
 ccattatcag caccagactg agcagctata tccttttatt aatcatggtc attcattcat 2460  
 tcattcattc acaaaatatt tatgatgtat ttactctgca ccagggtcca tgccaagcac 2520  
 tggggacaca gttatggcaa agtagacaaa gcatttggtc atttgagct tagagtccag 2580  
 gaggaatata ttagataatg acacaatcaa atataaattg caagatgtca cagggtgtgat 2640  
 gaagggagag taggagagac catgagtatg tgtaacagga ggacacagca ttattctagt 2700  
 gctgtactgt tccgtacggc agccactacc cacatgtaac tttttaagat ttaaatttaa 2760  
 attagttaac attcaaaacg cagctcccca atcacactag caacatttca agtgcttgag 2820  
 agccatgcat gattagtggg taccctattg aatagggtcag aagtagaatc ttttcatcat 2880  
 cacagaaagt tctattggac agtgctcttc tagatcatca taagactaca gagcactttt 2940  
 caaagctcat gcatgttcat catgttagtg tcgtattttg agctggggtt ttgagactcc 3000  
 ccttagagat agagaaacag acccaagaaa tgtgctcaat tgcaatgggc cacataccta 3060  
 gatctccaga tgtcatttcc cctctcttat ttaagttat gttaagatta ctaaaacaat 3120  
 aaaagctcct aaaaaatcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 3178

<210> 2  
 <211> 153  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

# ES 2 406 929 T3

```

gccctcagc aagaagccct gcctgatgag acagaggtgg tggaagaaac tgtggcagag    60
gtgactgagg tatctgtggg agctaattct gtccaggtgg aagtaggaga atttgatgat    120
gggtgcagagg aaaccgaaga ggaggtggtg gcg                                153

```

<210> 3  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

```

Ala Pro Gln Gln Glu Ala Leu Pro Asp Glu Thr Glu Val Val Glu Glu
1      5      10
Thr Val Ala Glu Val Thr Glu Val Ser Val Gly Ala Asn Pro Val Gln
20     25     30
Val Glu Val Gly Glu Phe Asp Asp Gly Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu
35     40     45
Val Val Ala
50

```

<210> 4  
 <211> 256  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

```

gaaaatccct gccagaacca cactgcaaa cacggcaagg tgtgagagct ggatgagaac    60
aacacccccca tgtgctgtgt ccaggacccc accagctgcc cagcccccat tggcgagttt    120
gagaaggtgt gcagcaatga caacaagacc ttcgactctt cctgccactt ctttgccaca    180
aagtgcaccc tggagggcac caagaagggc cacaagctcc acctggacta catcgggcct    240
tgcaaataca tcccccc                                256

```

<210> 5  
 <211> 85  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

# ES 2 406 929 T3

Glu Asn Pro Cys Gln Asn His His Cys Lys His Gly Lys Val Cys Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Asp Glu Asn Asn Thr Pro Met Cys Val Cys Gln Asp Pro Thr Ser  
 20 25 30  
 Cys Pro Ala Pro Ile Gly Glu Phe Glu Lys Val Cys Ser Asn Asp Asn  
 35 40 45  
 Lys Thr Phe Asp Ser Ser Cys His Phe Phe Ala Thr Lys Cys Thr Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Thr Lys Lys Gly His Lys Leu His Leu Asp Tyr Ile Gly Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Lys Tyr Ile Pro  
 85

<210> 6  
 <211> 450  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

cttgcctgga ctctgagctg accgaattcc ccctgcgcac gcgggactgg ctcaagaacg 60  
 tcctggtcac cctgtatgag agggatgagg acaacaacct tctgactgag aagcagaagc 120  
 tgcggttgaa gaagatccat gagaatgaga agcgcttggg ggcaggagac caccctgtgg 180  
 agctgctggc ccgggacttc gagaagaact ataacatgta catcttcctt gtacactggc 240  
 agttcggccg gctggaccag caccctattg acgggtacct ctccacacc gagctggctc 300  
 cactgcgtgc tccctcatc cccatggagc attgcaccac ccgctttttc gagacctgtg 360  
 acctggacaa tgacaagtac atcgccctgg atgagtgggc cggctgcttc ggcacatcaagc 420  
 agaaggatat cgacaaggat cttgtgatct 450

<210> 7  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

# ES 2 406 929 T3

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

<210> 8  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

Ala Pro Gln Gln Glu Ala Leu Pro Asp Glu Thr Glu Val Val Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Ala Glu Val Thr Glu  
 20

<210> 9  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9

Cys Gln Asn His His Cys Lys His Gly Lys Val Cys Glu Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Asn Asn Thr Pro Met Cys Val Cys Gln Asp Pro Thr Ser Cys Pro  
 20 25 30

<210> 10  
 <211> 303  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



<400> 10

Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Gln Gln Glu Ala Leu Pro Asp Glu Thr Glu Val Val Glu  
20 25 30

Glu Thr Val Ala Glu Val Thr Glu Val Ser Val Gly Ala Asn Pro Val  
35 40 45

Gln Val Glu Val Gly Glu Phe Asp Asp Gly Ala Glu Glu Thr Glu Glu  
50 55 60

Glu Val Val Ala Glu Asn Pro Cys Gln Asn His His Cys Lys His Gly  
65 70 75 80

Lys Val Cys Glu Leu Asp Glu Asn Asn Thr Pro Met Cys Val Cys Gln  
85 90 95

Asp Pro Thr Ser Cys Pro Ala Pro Ile Gly Glu Phe Glu Lys Val Cys  
100 105 110

Ser Asn Asp Asn Lys Thr Phe Asp Ser Ser Cys His Phe Phe Ala Thr  
115 120 125

Lys Cys Thr Leu Glu Gly Thr Lys Lys Gly His Lys Leu His Leu Asp  
130 135 140

Tyr Ile Gly Pro Cys Lys Tyr Ile Pro Pro Cys Leu Asp Ser Glu Leu  
145 150 155 160

Thr Glu Phe Pro Leu Arg Met Arg Asp Trp Leu Lys Asn Val Leu Val  
165 170 175

Thr Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Asp Asn Asn Leu Leu Thr Glu Lys Gln  
180 185 190

Lys Leu Arg Val Lys Lys Ile His Glu Asn Glu Lys Arg Leu Glu Ala  
195 200 205

Gly Asp His Pro Val Glu Leu Leu Ala Arg Asp Phe Glu Lys Asn Tyr  
210 215 220

Asn Met Tyr Ile Phe Pro Val His Trp Gln Phe Gly Gln Leu Asp Gln  
225 230 235 240

His Pro Ile Asp Gly Tyr Leu Ser His Thr Glu Leu Ala Pro Leu Arg  
245 250 255

Ala Pro Leu Ile Pro Met Glu His Cys Thr Thr Arg Phe Phe Glu Thr  
260 265 270

Cys Asp Leu Asp Asn Asp Lys Tyr Ile Ala Leu Asp Glu Trp Ala Gly  
275 280 285

Cys Phe Gly Ile Lys Gln Lys Asp Ile Asp Lys Asp Leu Val Ile  
290 295 300

# ES 2 406 929 T3

<210> 11  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 11  
  
 gccctcagc aagaagccct gcctgatgag acagaggtgg tggaagaaac tgtggcagag 60  
  
 gtgactgag 69  
  
 10 <210> 12  
 <211> 93  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 15 <400> 12  
  
 tgccagaacc accactgcaa acacggcaag gtgtgcgagc tggatgagaa caacaccccc 60  
 atgtgctgtt gccaggaccc caccagctgc cca 93  
  
 20 <210> 13  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 25 <400> 13  
  
 Glu Ser Ala Leu Cys Leu Pro Pro Ala Cys Leu Pro Leu Arg Val Pro  
 1 5 10 15  
  
 Ser Thr Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg  
 20 25 30  
  
 Ala Leu Ala  
 35  
  
 30 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 14  
  
 Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu  
 1 5 10 15  
  
 35 Ala  
  
 40 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 15

Ala Cys Leu Pro Leu Arg Val Pro Ser Thr Met Arg Ala Trp Ile Phe  
1 5 10 15

Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu Ala  
20 25

<210> 16

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Cys Leu Pro Pro Ala Cys Leu Pro Leu Arg Val Pro Ser Thr Met Arg  
1 5 10 15

Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu Ala  
20 25 30

10

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> B8 manipulado

20 <400> 17

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

Val Glu Thr Thr Glu Glu Val  
20

<210> 18

25 <211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> B14 manipulado

<400> 18

Val Pro Cys Lys Thr Gly Ser Lys Cys His Asn Asn Asp Pro Pro Thr  
1 5 10 15

Cys Asn Cys Glu Val Asp Met Cys Leu Gln His Gln Cys Glu His  
20 25 30

35

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado seleccionado de los aminoácidos 17-153 de SEC ID N° 10, en el que el polipéptido consiste en las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 o la SEC ID N° 9, o en el que el polipéptido consiste en fragmentos, variantes o análogos con una identidad de secuencia de al menos un 90 % con las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 o la SEC ID N° 9, o en el que el polipéptido consiste en las SEC ID N° 8 y hasta 50 aminoácidos adicionales localizados en el extremo carboxilo de la SEC ID N° 8, o consiste en la SEC ID N° 9 y hasta 50 aminoácidos adicionales localizados en el extremo amino o en el extremo carboxilo o en ambos extremos de la SEC ID N° 9, en el que el polipéptido aislado tiene actividad sensibilizante a la terapéutica para el cáncer.
2. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 o la SEC ID N° 9 que están modificados mediante acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y/o ubiquitinación.
3. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o 2.
4. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 3 seleccionado de uno o más de las siguientes: SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, o en el que el polinucleótido consiste en fragmentos, variantes o análogos con una identidad de secuencia de al menos un 90 % con las SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, en el que los fragmentos, variantes o análogos conservan la actividad sensibilizante a la terapéutica para el cáncer cuando se expresa.
5. Una composición que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4, la SEC ID N° 6, la SEC ID N° 11 o la SEC ID N° 12, un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 o la SEC ID N° 9 o un polipéptido aislado, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 y hasta 50 aminoácidos adicionales localizados en el extremo carboxilo de la SEC ID N° 3, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 5 y hasta 50 aminoácidos adicionales localizados en el extremo amino de la SEC ID N° 5, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 8 y hasta 50 aminoácidos adicionales localizados en el extremo carboxilo de la SEC ID N° 8 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 9 y hasta 50 aminoácidos adicionales localizados en el extremo amino o en el extremo carboxilo o en ambos extremos de la SEC ID N° 9.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 5.
7. Una composición que comprende dos o más de los polipéptidos de la reivindicación 5 o 6 y/o dos o más de los polinucleótidos de la reivindicación 5 o 6.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que además comprende un agente terapéutico contra el cáncer.
9. La composición de la reivindicación 7, que comprende al menos uno de los polipéptidos de la reivindicación 5 y al menos uno de los polinucleótidos de las reivindicaciones 4 o 7.
10. La composición de la reivindicación 8, en la que el agente terapéutico para el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes radioterapéuticos, uno o más agentes terapéuticos alternativos y combinaciones de los mismos.
11. Un polipéptido aislado para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el uso comprende:
  - (a) suministrar el polipéptido aislado seleccionado de una o más de las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 y la SEC ID N° 9 a una célula; y
  - (b) administrar un agente terapéutico contra el cáncer a la célula.
12. El polipéptido aislado de la reivindicación 11, en el que el suministro y la administración son simultáneas, el suministro precede al tratamiento o la administración precede al suministro.
13. El polipéptido aislado de la reivindicación 11, en el que el uso comprende:
  - (a) liberar un vector que comprende un polinucleótido seleccionado de una o más de las SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4, la SEC ID N° 11 y la SEC ID N° 12; a una célula;

- (b) expresar la secuencia portada por el vector, y
- (c) administrar un agente terapéutico contra el cáncer a la célula.
14. El polipéptido aislado de la reivindicación 11 o 12, en el que el agente terapéutico para el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes radioterapéuticos, uno o más agentes terapéuticos alternativos y combinaciones de los mismos.
15. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el polipéptido comprende las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 o la SEC ID N° 9.
16. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el polinucleótido comprende las SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4, la SEC ID N° 11 o la SEC ID N° 12.
17. El polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la célula es una célula cancerosa resistente a un régimen terapéutico.
18. Un vector que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, y fragmentos, variantes o análogos de los mismos con una identidad de secuencia de al menos un 90 % con las SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, en el que los fragmentos, variantes o análogos de los mismos conservan la actividad sensibilizante a la terapéutica para el cáncer cuando se expresa.
19. El vector de la reivindicación 18, en el que el polinucleótido aislado está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 20, El vector de las reivindicaciones 18 o 19, en el que el vector es adecuado para terapia génica.
21. Una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4, en la que el nucleótido está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión.
22. Una célula transfectada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.
23. Una célula operable para expresar los polipéptidos de la reivindicación 1.
24. Un procedimiento ex vivo o in vitro de expresión de un polipéptido, que comprende:
- (a) proporcionar un vector de expresión que codifica el polipéptido, en el que el polipéptido está seleccionado de una o más de las siguientes: SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, o en el que el polipéptido consiste en fragmentos, variantes o análogos con una identidad de secuencia de al menos un 90 % con las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 8 o la SEC ID N° 9, en el que los fragmentos, variantes o análogos conservan la actividad sensibilizante a la terapéutica para el cáncer.
- (b) introducir el vector en una célula; y
- (c) mantener la célula en condiciones que permitan la expresión.

**FIGURA 1**

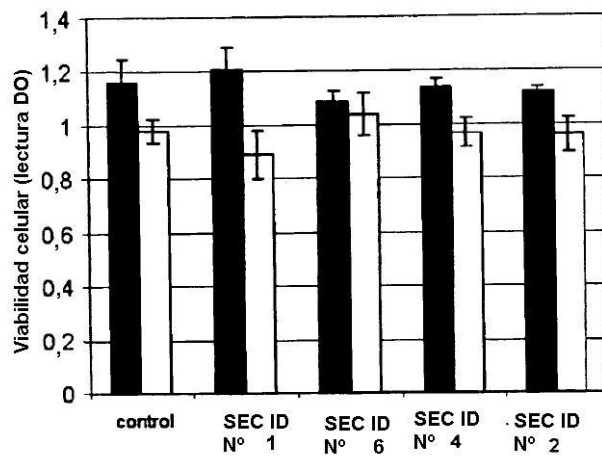


FIGURA 2

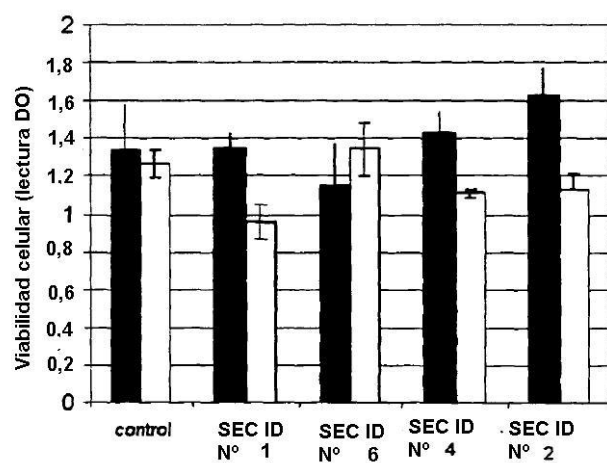


FIGURA 3

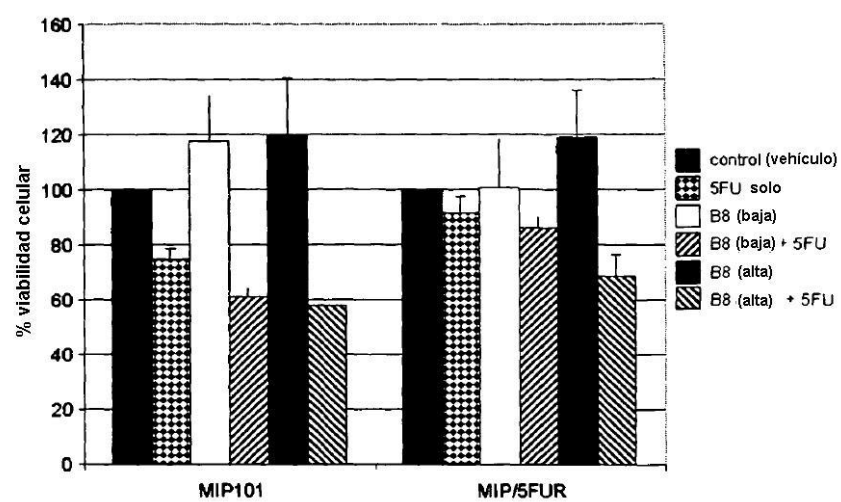




FIGURA 4

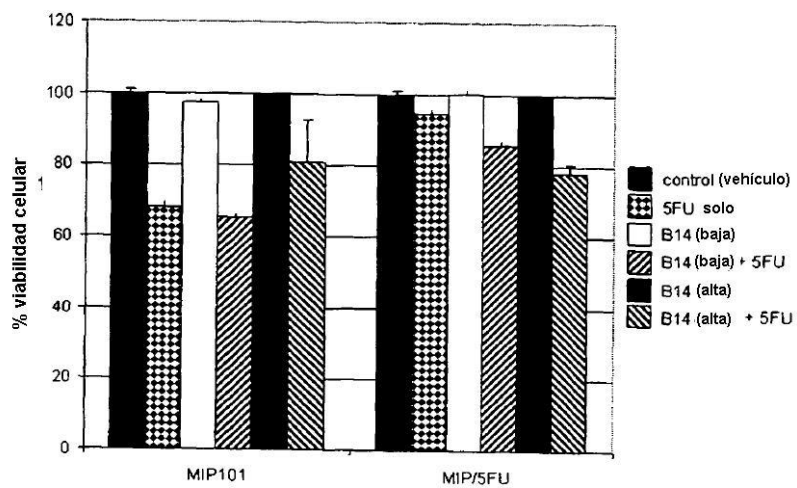


FIGURA 5

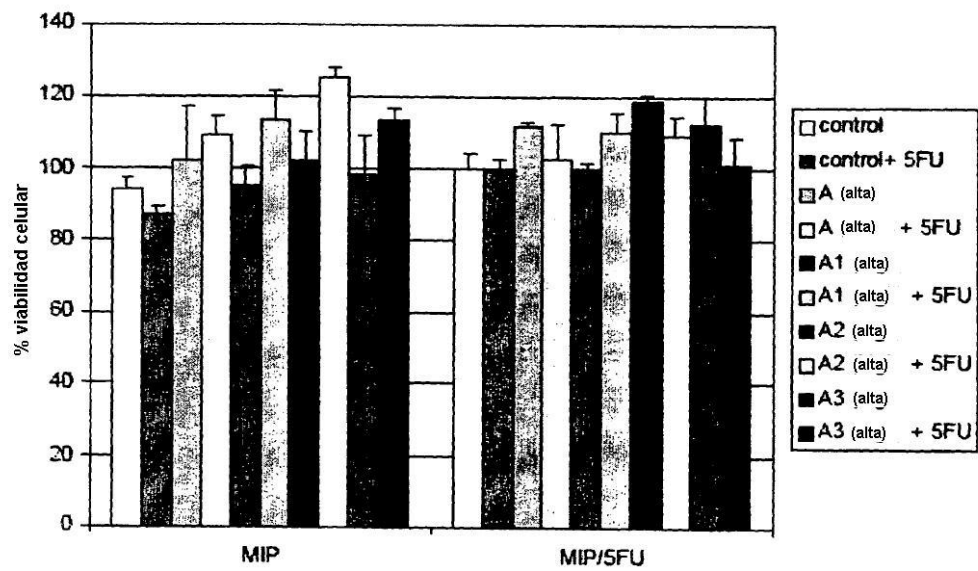


FIGURA 6

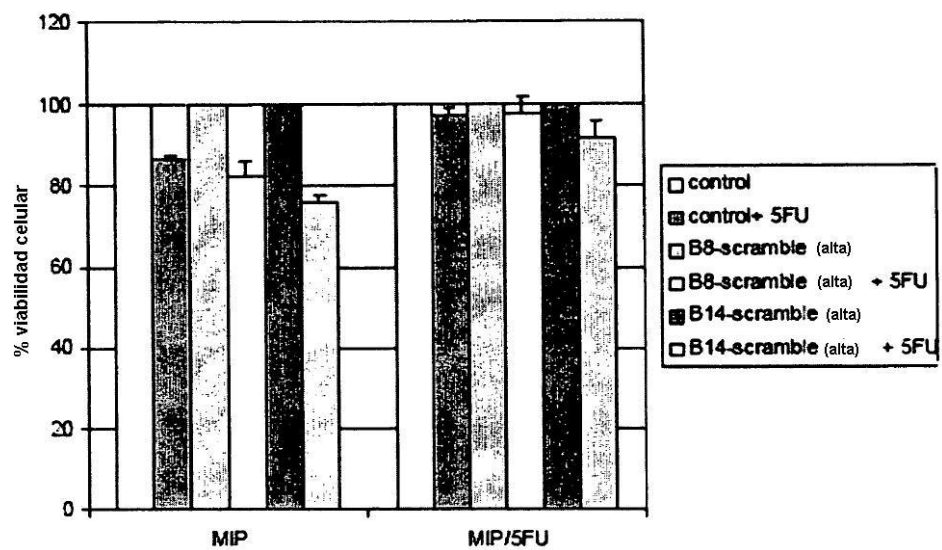


FIGURA 7

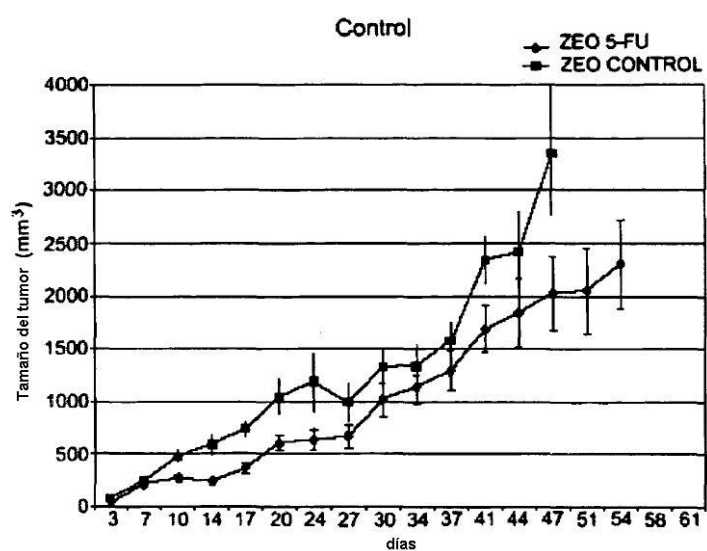


FIGURA 8

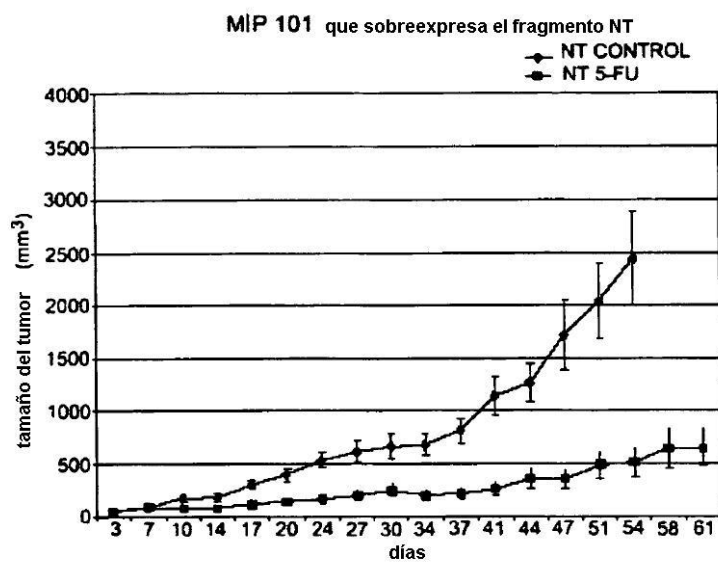


FIGURA 9

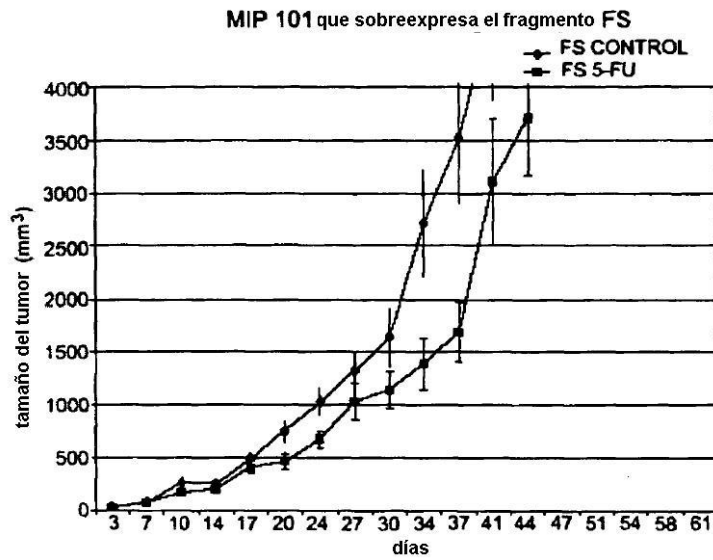


FIGURA 10

