

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 551**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/54 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013** **PCT/EP2013/077747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14096384**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013** **E 13821470 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2934564**

54 Título: **Factor antisecretor (AF) para el uso en el tratamiento del glioblastoma**

30 Prioridad:

20.12.2012 SE 1251473

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

10.09.2018

73 Titular/es:

LANTMÄNNEN AS-FAKTOR AB (100.0%)
Box 30192
10425 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

HANSSON, HANS-ARNE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 680 551 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

Factor antiseoretor (AF) para el uso en el tratamiento del glioblastoma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una proteína de factor antiseoretor (AF), péptido, derivado, homólogo, y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad funcional equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, como adyuvante para el tratamiento del glioblastoma y/o para optimizar la administración y absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica, tal como un fármaco antineoplásico, terapia inmunitaria, radioterapia o la administración de un gen a una célula tumoral de glioblastoma.

10 En otro aspecto, la presente descripción se refiere al diseño de una herramienta de diagnóstico y/o pronóstico nueva y fiable para monitorizar y/o verificar y/o mejorar el control terapéutico del glioblastoma en un sujeto que padece un glioblastoma.

Antecedentes de la invención

15 El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario maligno más habitual y más agresivo en seres humanos, que implica las células gliales y representa una gran fracción de todos los tumores intracraneales. Es la forma neoplásica más prevalente de los alrededor de 120 tipos diferentes de tumores cerebrales primarios. La incidencia anual de GBM es de 2-3 casos por 100.000 personas en Europa y Norteamérica. Según la clasificación de la OMS de tumores del sistema nervioso central, el nombre estándar para este tumor cerebral es "glioblastoma", y se presenta en varias variantes.

20 El glioblastoma multiforme (GBM) se reconoce como la forma más frecuente y letal de cáncer del sistema nervioso central. Las técnicas quirúrgicas, los agentes quimioterápicos, y las estrategias de inmunoterapia y radioterapia usadas en la actualidad han tenido poca eficacia sobre la esperanza de vida de los pacientes diagnosticados de GBM. La dificultad en el tratamiento de esta enfermedad maligna reside tanto en su complejidad intrínseca como en sus elaborados mecanismos de resistencia farmacológica.

25 El glioblastoma tiene el peor pronóstico de todas las neoplasias malignas del sistema nervioso central (SNC) a pesar del tratamiento multimodal, que consiste en la extirpación quirúrgica de la mayor cantidad posible del tumor, con quimioterapia simultánea o secuencial, radioterapia, terapia antiangiogénica, inmunoterapia, radiocirugía con bisturí de rayos gamma, y tratamiento sintomático con corticosteroides. El pronóstico es muy malo, con un periodo de supervivencia mediano de aproximadamente un año, y la enfermedad es mortal casi siempre, ya que solamente alrededor del 3 % sobrevive durante más de 3 años.

30 Los tumores de glioblastoma multiforme, también denominados de Grado IV, se caracterizan por la presencia de áreas de tejido necrosado que están rodeadas por células anaplásicas con numerosa mitosis y proliferación endotelial. Esta característica, así como la presencia de vasos sanguíneos anormales hiperplásicos, diferencia el tumor de los astrocitomas de Grado III, que no tienen estas características.

35 Existen varios subtipos de glioblastoma. El noventa y siete por ciento de los tumores del subtipo "clásico" portan copias extra del gen de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y la mayoría tienen una expresión mayor de la normal de EGFR, mientras el gen TP53, que a menudo está mutado en el glioblastoma, casi nunca está mutado en este subtipo. En contraste, el subtipo proneuronal a menudo tiene tasas elevadas de alteraciones en TP53, y en PDGFR α , el gen que codifica el tipo α del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, y en IDH1, el gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa 1. El subtipo mesenquimal se caracteriza por tasas elevadas de mutaciones u otras alteraciones en NF1, el gen que codifica la Neurofibromatosis de tipo 1, menos alteraciones en el gen EGFR y menor expresión de EGFR que otros tipos.

40 Los tumores de GBM aparecen normalmente en la sustancia blanca cerebral, crecen rápidamente, y pueden hacerse muy grandes antes de provocar síntomas. Menos del 10% se forman más lentamente, tras la desdiferenciación de un astrocitoma de bajo grado o astrocitoma anaplásico. Estos se denominan tumores de GBM secundarios y son más comunes en pacientes jóvenes (edad media de 45 frente a 62 años). El tumor se puede diseminar a las meninges o la pared ventricular, lo que conduce a un contenido elevado de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (> 100 mg/dL), así como a una pleocitosis ocasional de 10 a 100 células, principalmente linfocitos. Las células malignas portadas en el LCR se pueden diseminar (con poca frecuencia) a la médula espinal o provocar gliomatosis meníngea. Sin embargo, la metástasis de GBM fuera del sistema nervioso central es extremadamente poco frecuente. Alrededor del 50% de los tumores de GBM ocupan más de un lóbulo de un hemisferio o son bilaterales. Los tumores de este tipo surgen normalmente del telencéfalo, y pueden exhibir con poca frecuencia la infiltración clásica a través del cuerpo caloso, produciendo un glioma en alas de mariposa (bilateral).

55 El tumor puede adquirir una diversidad de aspectos, dependiendo de la cantidad de hemorragia, necrosis, y/o su edad. Un barrido CT mostrará normalmente una masa heterogénea con un centro hipodenso y un anillo de realce variable rodeado de edema. El efecto de masa del tumor y el edema puede comprimir los ventrículos y provocar, p.ej., hidrocefalia así como distorsión mecánica y hernia.

Se cree que la formación de vasculatura tumoral anormal, disfuncional, y las células similares a las células madre de glioblastoma (GSCs) son un componente importante de la incapacidad de tratar de manera eficaz los tumores de GBM. Además, las células tumorales se envuelven en un revestimiento protector de glucocáliz, que impide el acceso, p.ej., de fármacos para alcanzar y ejercer su acción en las células tumorales.

- 5 El tratamiento de los tumores cerebrales primarios y las metástasis cerebrales consiste en terapias curativas, sintomáticas y paliativas.

Los agentes de apoyo primarios para la terapia sintomática son anticonvulsivos y corticosteroides.

- 10 El tratamiento curativo y paliativo incluye la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia. Normalmente se lleva a cabo una extirpación viable lo mayor posible junto con radiación y quimioterapia. La extirpación total macroscópica del tumor está asociada a un mejor pronóstico.

Desafortunadamente, se sabe que los tumores de GBM contienen zonas de tejido que exhiben hipoxia que son muy resistentes a la radioterapia. Se ha demostrado que las células madre tumorales prevalecen y son resistentes a la terapia disponible. Se han intentado hasta la fecha diversas aproximaciones de quimioterapia, inmunoterapia y agentes radiosensibilizadores con un éxito limitado.

- 15 Además, entre otros tratamientos, en la actualidad también se prueban tratamientos terapéuticos de transferencia génica y con proteínas.

- 20 El periodo de supervivencia mediano desde el momento del diagnóstico sin ningún tratamiento es de 3 meses, y con una terapia completa, como se utiliza en la actualidad, alrededor de un año. Solamente un quinto sobrevive durante 2 años después de una terapia moderna y exhaustiva. La edad creciente (> 60 años de edad) conlleva un riesgo de peor pronóstico. La muerte se debe normalmente a edema cerebral y/o presión intracraneal incrementada y, además, se debe a los efectos de la masa que dificultan la circulación sanguínea y provocan una hernia cerebral.

Así, existe la necesidad desde hace mucho tiempo de un tratamiento mejorado y/u optimizado para los tumores de GBM.

- 25 El factor antisecretor (AF) es una proteína de 41 kDa que en un principio se describió que proporcionaba protección contra las enfermedades diarreicas y la inflamación intestinal (para una revisión, véase Lange y Lönnroth, 2001). La proteína de factor antisecretor (AF) se ha secuenciado, y se ha clonado su cADN. La actividad antisecretora parece estar ejercida principalmente por un péptido localizado entre las posiciones de aminoácidos 35 y 50 en la secuencia de la proteína de factor antisecretor (AF), y que comprende al menos 4-16, tal como 4, 6, 7, 8 o 16 aminoácidos de la secuencia consenso. Las investigaciones inmunoquímicas e inmunohistoquímicas han revelado que la proteína de factor antisecretor (AF) está presente y se puede sintetizar también en la mayoría de los tejidos y órganos de un organismo. Los péptidos sintéticos, que comprenden la secuencia antidiarreica, se han caracterizado anteriormente (documentos WO 97/08202; WO 05/030246). Se han descrito previamente que las proteínas y péptidos de factor antisecretor (AF) normalizan el transporte patológico de líquido y/o las reacciones inflamatorias, tal como en el intestino y el plexo corioideo del sistema nervioso central tras la exposición a la toxina del cólera (documento WO 35 97/08202). Por lo tanto, se ha propuesto que los alimentos y piensos con la capacidad de inducir la síntesis endógena de AF o la absorción del AF añadido son útiles para el tratamiento del edema, diarrea, deshidratación e inflamación en el documento WO 97/08202. El documento WO 98/21978 describe el uso de productos que tienen actividad enzimática para la producción de un alimento que induce la formación de proteínas de factor antisecretor (AF). El documento WO 00/038535 describe además productos alimenticios enriquecidos en proteínas nativas de 40 factor antisecretor (AF).

- 45 También se ha demostrado que las proteínas de factor antisecretor (AF) y fragmentos de las mismas mejoran la reparación del tejido nervioso, y la proliferación, apoptosis, diferenciación, y/o migración de células madre y progenitoras y células derivadas de las mismas en el tratamiento de afecciones asociadas a la pérdida y/o aumento de células (documento WO 05/030246) y son igualmente eficaces en el tratamiento y/o la prevención de la hipertensión intraocular (documento WO 07/126364), como para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental (documento WO 07/126363).

- 50 Además, los presentes inventores demostraron recientemente que AF es capaz de monitorizar y/o afectar de manera beneficiosa a la estructura, distribución y múltiples funciones de las balsas lipídicas, receptores y/o caveolas en las membranas, y por tanto se podría emplear para el tratamiento y/o la prevención de la desorganización estructural y la disfunción de las balsas lipídicas y/o caveolas en las membranas celulares (documento WO 07/126365).

- 55 Los presentes inventores han sido capaces de demostrar además que la misma proteína de factor antisecretor (AF), péptidos y fragmentos de la misma pueden intervenir en la activación biológica de proteínas transmembrana, p.ej. NKCC1 a través de FAK y CAP, y que así pueden regular directamente la actividad patológica del canal iónico en células patológicas y/o alteradas, lo que normaliza de manera eficaz la presión intracelular y la función de las proteínas transmembrana en dichas células, y así permite una absorción mejorada de los fármacos usados, p.ej., en la terapia del cáncer (documento WO 2010/093324).

La presente solicitud describe por primera vez que las proteínas de factor antiselector (AF), péptidos, homólogos y/o fragmentos de las mismas se pueden usar además en terapias sintomáticas, curativas y paliativas para el glioblastoma. En particular, se pueden usar como adyuvante y/o para optimizar la administración de fármacos y de genes, así como la quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia en el tratamiento del glioblastoma.

5 **Sumario de la presente invención**

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

La presente solicitud describe por primera vez una aproximación eficaz buscada durante mucho tiempo para el tratamiento de tumores de GBM. Describe sorprendentemente que se puede usar el factor antiselector AF en las terapias sintomáticas, curativas y paliativas del glioblastoma. En particular, se puede usar como adyuvante y/o para optimizar la administración de fármacos y de genes, así como la quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia en el tratamiento del glioblastoma.

Como se puede observar en la sección experimental, la presente solicitud describe por primera vez un fragmento de una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), para el uso en la disminución de la presión intracraneal elevada provocada por un tumor de glioblastoma hasta un nivel aceptable, alrededor de 20 mm Hg o inferior, así como para favorecer y/o mejorar la entrada de una sustancia quimioterápica en las células tumorales de glioblastoma.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo, y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende al menos una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM). En una realización, se refiere a un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma, para el uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM).

La proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma, como se define en la presente memoria, se puede usar para la fabricación de una composición para el uso en la terapia sintomática, curativa y/o paliativa del glioblastoma y/o en un método para el tratamiento sintomático, curativo y/o paliativo del glioblastoma.

En particular, la proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma se puede usar para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica adicional y/o la administración de un gen para el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM). Por otra parte, la proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma, se puede usar como fármaco en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM) por sí misma.

Leyendas de las figuras

Figura 1:

Sección transversal de un cerebro de rata con un glioblastoma RG2-N32 (tinción oscura; día 22) en el centro, delimitado por tejido cerebral edematoso (naranja claro). Obsérvese que el hemisferio derecho en el centro de la fotografía está agrandado, lo que provoca un desplazamiento de la línea media así como dislocación y deformación de la línea media y de los ventrículos laterales.

Figura 2:

Mayor aumento de la Fig. 1. El tumor sumamente celular está invadiendo el tejido cerebral mediante extensiones similares a dedos, lo que hace que el tumor sea difícil de delimitar.

Figura 3:

Micrografía de fluorescencia de un glioblastoma RG2-N32, procesada para la demostración del glucocáliz, que delimita cada célula tumoral. Cada célula tumoral está encerrada por un glucocáliz rico en α -N-acetilgalactosamina (verde/marcado mediante flechas blancas) así como, en menor grado, en α -N-acetilglucosamina (rojo). Obsérvese la tinción roja de los eritrocitos. Dos grandes vasos sanguíneos están marcados mediante flechas negras.

Figura 4:

Una rata anestesiada reposa sobre su abdomen. El cráneo está expuesto, y las guías de luz a dos sensores de presión Samba entran en el cerebro a través de orificios en el cráneo. Las dos guías de luz (flechas) se fijan

mediante instrumentos de soporte al llevar a cabo los experimentos, pero en esta fotografía están libres para simplificar la ilustración.

Figura 5:

5 Se visualiza que la presión intracraneal elevada es del orden de 30 mm Hg durante la media hora de registro en una rata con un glioblastoma (día 22). La presión correspondiente en una rata normal es $5,3 \pm 2,1$ mm Hg. Tanto la masa tumoral en expansión como el edema cerebral contribuyen a la presión elevada.

Figura 6:

10 La presión intracraneal en una rata con un glioblastoma se incrementará con el tiempo, y finalmente provocará una gran deformación cerebral y dislocación, así como hernia y colapso circulatorio. En la actualidad apenas hay opciones disponibles que permitan la recuperación del animal de los efectos perjudiciales de la expansión tumoral y del edema cerebral. El animal se sacrificó en el momento indicado por una flecha.

Figura 7:

15 La presión intracraneal en una rata con un glioblastoma disminuye, comenzando alrededor de 12 minutos tras la administración nasal de AF-16 (4 mg/kg p.c.). Las líneas rojas y azules muestran que la caída de la presión continúa de manera concomitante en cada hemisferio cerebral, y alcanza en media hora una presión del orden de 20 mm Hg, que se considera un nivel aceptable.

Figura 8:

La presión intracraneal en una rata con un glioblastoma se reduce, comenzando alrededor de 15 min tras la instilación nasal de AF-6 (1 mg/kg p.c.). Después de casi media hora se alcanzan 17,7 mm Hg.

20 Figuras 9 y 10:

Se instiló a ratas con un glioblastoma en el hemisferio cerebral derecho el vehículo, agua (Fig. 9), o AF-16 (4 mg/kg p.c.) de manera nasal 1 h antes de una inyección intravenosa del marcador doxorubicina (10 mg/kg p.c.). Los cerebros se extrajeron 30 min más tarde de los animales anestesiados, y se procesaron para la microscopía de fluorescencia. El pretratamiento con AF-16 (Fig. 10) incrementó tanto la intensidad de la tinción como la frecuencia de núcleos teñidos de células tumorales (las células ejemplificadas indicadas con flechas blancas), en comparación con el conseguido tras el pretratamiento con el vehículo (Fig. 9). Este resultado documenta que AF-16 facilita la absorción y unión del marcador a las estructuras intracelulares de las células tumorales, es decir, el objetivo del tratamiento.

Definiciones y abreviaturas

30 **Abreviaturas**

IFP: presión del líquido intersticial;

PBS: solución salina tamponada con fosfato;

AF: factor antisecretor,

Proteína AF de longitud completa (como se muestra en SEQ ID N°: 1)

35 AF-6: un hexapéptido CHSKTR (como se muestra en SEQ ID N°: 2);

AF-16: un péptido compuesto de los aminoácidos VCHSKTRSNPENNVL (como se muestra en SEQ ID N°: 3);

AF-8: un heptapéptido VCHSKTR (como se muestra en SEQ ID N°: 4);

Octapéptido IVCHSKTR (como se muestra en SEQ ID N°: 5);

Pentapéptido HSKTR (como se muestra en SEQ ID N°: 6).

40 SPC: Cereales especialmente procesados

RTT: Método para medir una respuesta de secreción estandarizada en intestino delgado de rata, como se publicó en el documento SE 9000028-2 (número de publicación 466331) para medir el contenido de AF (ASP).

Definiciones

45 Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también se denominan polipéptidos. En

general, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácidos, y por lo tanto tienen pesos moleculares en el intervalo de alrededor de 6.000 a alrededor de varios cientos de miles de Daltons o más. Las proteínas pequeñas se denominan péptidos, polipéptidos, u oligopéptidos. Los términos "proteína", "polipéptido", "oligopéptido" y "péptido" se pueden usar de manera intercambiable en el presente contexto. Los péptidos pueden tener muy pocos residuos de aminoácidos, tal como 2-50 residuos de aminoácidos (aa).

Una "composición farmacéutica", en el presente contexto, se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente activa de una proteína de factor antiselector (AF), opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéuticamente activo, tal como un portador o un vehículo. Dicha composición farmacéutica se formula para la vía de administración adecuada, que puede variar dependiendo del estado del paciente, así como de otros factores, tales como la edad o la elección preferida. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) puede servir como sistema de administración de fármacos. La composición farmacéutica tras la administración presenta la sustancia activa al organismo de un ser humano o un animal. Dicha composición farmacéutica puede estar en forma, p.ej., de comprimidos, píldoras, pastillas, cápsulas, supositorios, geles, soluciones, etc., pero no se limita a ellas.

La expresión "sal farmacéuticamente activa" se refiere a una sal de una proteína de factor antiselector (AF), péptido, o polipéptido, o un homólogo y/o fragmento de la misma que puede ser cualquier sal derivada de ella, basándose en la denominada serie de Hofmeister. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente activas comprenden trifluoroacetato, acetato y cloruro de lisina, y la invención no se limita a ellas.

El término "antiselector" se refiere en el presente contexto a inhibir o disminuir la secreción y/o transferencia de líquidos. Por lo tanto, la expresión "proteína de factor antiselector (AF)" se refiere a una clase de proteínas capaces de inhibir o disminuir o modular de otra manera la transferencia de líquidos, así como la secreción en un organismo.

En el presente contexto, "actividad equivalente" se refiere al efecto biológico de la proteína de factor antiselector (AF), péptido, o polipéptido, o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma, es decir, su capacidad de mejorar la terapia y/o el uso en el tratamiento del glioblastoma. Los ejemplos estandarizados para el ensayo y/o la medición de tal capacidad son muy conocidos en el campo de la técnica. Se proporcionan ejemplos en la sección experimental de esta solicitud, tal como en los ejemplos 1 - 4.

En el presente contexto, las expresiones "proteína de factor antiselector", "proteína de factor antiselector (AF)", "proteína AF", AF, o un homólogo, derivado o fragmento de la misma, se pueden usar de manera intercambiable con la expresión "factores antiselectores" o "proteínas de factores antiselectores" como se definieron en el documento WO 97/08202, y se refieren a una proteína de factor antiselector (AF) o un péptido o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma que tiene una actividad antiselectora y/o equivalente funcional y/o análogo, o a una modificación de la misma que no altera la función del polipéptido. Por lo tanto, se debe entender que un "factor antiselector", "proteína de factor antiselector", "péptido antiselector", "fragmento antiselector", o una "proteína de factor antiselector (AF)", en el presente contexto, también se puede referir a un derivado, homólogo o fragmento de la misma. Todas estas expresiones se pueden usar de manera intercambiable en el contexto de la presente invención. Además, en el presente contexto, la expresión "factor antiselector" se puede abreviar como "AF". La proteína de factor antiselector (AF), en el presente contexto, también se refiere a una proteína con propiedades antiselectoras como se definió previamente en los documentos WO97/08202 y WO 00/38535. También se han descrito factores antiselectores, p.ej., en el documento WO 05/030246. También se incluyen en la expresión factor antiselector los factores antiselectores nativos de yema de huevo enriquecidos en factores antiselectores como se describió en los documentos SE 900028-2 y WO 00/38535, como se describe adicionalmente más adelante.

Un "alimento médico", en el presente contexto, se refiere a un alimento, un suplemento alimenticio, o un alimento para un uso alimenticio especial, que se ha preparado con una proteína de factor antiselector (AF), o, de manera alternativa, tiene la capacidad de inducir la síntesis y/o activación del AF endógeno. Dicho alimento puede ser cualquier alimento adecuado, en forma líquida o sólida, tal como un líquido o un polvo, o cualquier otro producto alimenticio adecuado. Los ejemplos de tal materia se pueden hallar en los documentos WO 0038535 o WO 91/09536.

Un "nebulizador", en el presente contexto, se refiere a un dispositivo médico que administra una medicación líquida en forma de una niebla en las vías respiratorias.

El término "aerosol", en el presente contexto, se refiere a una suspensión gaseosa de partículas finas sólidas o líquidas.

En el presente contexto, se usa la expresión "agente citostático", así como "fármacos citostáticos", "agentes citostáticos", o "compuestos citostáticos", las expresiones son intercambiables y se refieren a fármacos que se usan en la terapia del cáncer y que se administran en general a pacientes sometidos a quimioterapia (los agentes citostáticos son los denominados fármacos antineoplásicos). Los agentes citostáticos son sustancias que controlan el crecimiento de las células patológicas, y también de las células normales. Tales sustancias se usan, por lo tanto, para el tratamiento quimioterápico de tumores, pero también para el tratamiento posoperatorio y/o tras la radioterapia después de la extracción de un tumor. Los agentes citostáticos pueden estar en forma líquida, en polvo o granular, y

también opcionalmente ultracongelada. La persona experta en la técnica ajustará la elección y la dosis del agente citostático a partir de un gran número de agentes citostáticos disponibles comercialmente.

En el presente contexto, se usa la expresión "agente citotóxico", así como "fármacos citotóxicos", "agentes citotóxicos", o "compuestos citotóxicos", las expresiones son intercambiables y se refieren a fármacos que se usan en la terapia del cáncer y que se administran en general a pacientes sometidos a quimioterapia (los agentes citotóxicos son los denominados fármacos antineoplásicos). Los agentes citotóxicos son sustancias que son tóxicas para las células, y de ese modo pueden controlar el crecimiento de las células patológicas, y también de las células normales. Tales sustancias se usan, por lo tanto, para el tratamiento quimioterápico de tumores, pero también para el tratamiento posoperatorio después de la extracción de un tumor, o tras la radioterapia. Los agentes citotóxicos pueden estar en forma líquida, en polvo o granular, y también opcionalmente ultracongelada. La persona experta en la técnica ajustará la elección y la dosis del agente citotóxico a partir de un gran número de agente citotóxicos disponibles comercialmente.

En el presente contexto, el término "adyuvante" se usa para describir un agente farmacológico y/o inmunológico que modifica el efecto de otros agentes. Los adyuvantes de la presente solicitud aumentan u optimizan el uso del receptor de la sustancia activa administrada, por lo que se minimiza la cantidad necesaria de dicha sustancia.

Los tumores de glioblastoma multiforme pueden ser, en el presente contexto, glioblastoma de células gigantes o gliosarcoma.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de una proteína de factor antiselector (AF), péptido, derivado, homólogo, y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad funcional equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM) y/o para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica, tal como un fármaco antineoplásico, radioterapia, terapia que se basa en mecanismos inmunológicos o una administración de un gen a una célula tumoral de glioblastoma.

La presente solicitud describe por primera vez medios y/o una aproximación eficaz buscados durante mucho tiempo para el tratamiento de tumores de GBM. Describe sorprendentemente que se pueden usar factores antiselectores en las terapias sintomáticas, curativas y paliativas del glioblastoma. En particular, se pueden usar como adyuvante y/o para optimizar la administración de fármacos y de genes, así como la quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia en el tratamiento del glioblastoma.

En particular, la proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína AF y/u homólogo y/o fragmento de la misma, se usa en la presente memoria para optimizar la circulación sanguínea y/o la tensión de oxígeno en un tumor de GBM, lo que facilita los efectos de la radioterapia así como de la inmunoterapia y/o quimioterapia.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM). En una realización, se refiere a un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma, para el uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al diseño de una herramienta de diagnóstico y/o pronóstico nueva y fiable para monitorizar y/o verificar y/o mejorar el control terapéutico del glioblastoma (un tumor GBM) en un sujeto que padece un glioblastoma. Una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, se usa en la presente memoria para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica en una célula tumoral de GBM. Dicha sustancia y/o formulación farmacéutica se selecciona en el presente contexto del grupo que consiste en un fármaco antineoplásico, fármaco antitumoral, radioterapia, sustancias y/o células inmunológicas y sustancias antibióticas, un fármaco dirigido a una lesión postraumática, un fármaco dirigido a la neurodegeneración, y un fármaco contra afecciones inflamatorias.

Los ejemplos bien conocidos en el campo se seleccionan, pero sin limitación, del grupo que comprende un agente alquilante, tal como temozolomida y Gliadel®, que es una oblea implantable de carmustina alquilante. Además, se incorporan anticuerpos hacia el factor de crecimiento endotelial vascular.

Los mejores resultados a largo plazo para la terapia del glioblastoma se han conseguido hasta ahora mediante el uso de la combinación de temozolomida y radiación. Se debería insistir en que la eficacia de la radiación mejora mediante una tensión de oxígeno tisular elevada, que facilita la generación de radicales libres. Así, la presente invención se refiere a una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de

aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el uso en la optimización de la administración y/o absorción celular de temozolomida, de manera alternativa en combinación con radiación en una célula tumoral de GBM.

5 La presente invención se refiere igualmente a la fabricación de una formulación farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y temozolomida, para el uso en el tratamiento del glioblastoma, opcionalmente en combinación con radiación.

10 Un obstáculo para la quimioterapia y la radiación es que las células tumorales de GBM individuales están encerradas por un revestimiento, compuesto claramente por el glucocáliz que tapiza la superficie extracelular de las células. De ese modo, la eficacia de la terapia se ve dificultada, a menudo hasta tal punto que se dan efectos limitados a corto y largo plazo. Los tumores de glioblastoma tienen una red muy rica y elaborada de vasos sanguíneos, pero la envoltura de las células tumorales reduce en gran medida el transporte a las células tumorales de los agentes quimioterápicos, así como, p.ej., del oxígeno.

15 La presente invención se refiere a una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el uso para superar los obstáculos para que los agentes quimioterápicos y el oxígeno alcancen sus objetivos, las células tumorales individuales de GBM.

20 La presente invención se refiere igualmente a la fabricación de una formulación farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF), péptido, derivado, homólogo, y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad funcional equivalente, o una modificación de la misma que no altera la función del polipéptido, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el uso para superar los obstáculos para que los agentes quimioterápicos y el oxígeno alcancen sus objetivos, las células tumorales individuales de GBM.

25 El edema cerebral es un evento temprano en el crecimiento del glioblastoma, y se da hasta un grado, creciente con el tiempo, que habitualmente no se limita a la región del tumor, sino que se desarrolla por todo el cerebro. Esto significa que el contenido dentro del cráneo rígido se expande no solamente por el crecimiento del tumor y la existencia de hemorragias, sino también debido a la formación del edema. A medida que el cráneo rígido resiste la expansión, la presión intracraneal crece, lo que restringe la circulación sanguínea, a la vez que se deforma y distorsiona el tejido cerebral. La presión intracraneal elevada provocará al paciente síntomas neurológicos y psiquiátricos de gravedad creciente. Un objetivo importante en el tratamiento del glioblastoma es, por tanto, reducir el edema cerebral y de ese modo la presión intracraneal, lo que facilita, p.ej., la circulación sanguínea, lo que provisionalmente mejora el acceso de los agentes quimioterápicos y, p.ej., del oxígeno, y por lo tanto de los radicales libres a las células tumorales. Un efecto beneficioso adicional es mejorar el bienestar de los pacientes que padecen glioblastoma reduciendo el edema cerebral y la presión intracraneal.

35 El factor antiselector (AF) regula y/o normaliza de manera eficaz la actividad anormal de canales específicos de iones y/o de fluido en las células alteradas y patológicas, y de ese modo se normalizan de manera eficaz las dimensiones y la presión intracelular en la célula, lo que a su vez también puede conducir a normalizar la presión intersticial en un tejido alterado, y así permitir potencialmente una absorción celular mejorada de una sustancia farmacéutica, tal como los fármacos usados en el tratamiento del glioblastoma.

40 Como se muestra en la sección experimental, AF-16, un fragmento de una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), podría demostrar que reduce la presión intracraneal elevada que predomina en la cabeza de los animales con un glioblastoma inducido de manera experimental. Este efecto sumamente beneficioso se indujo de manera reproducible mediante la administración de AF-16. Se debería insistir en que AF-16 redujo la presión intracraneal no solamente en el hemisferio del tumor, sino también en el hemisferio contralateral, que es edematoso a pesar de no contener ningún tumor. Además, un efecto crucial de la administración de AF-16 h fue que se mejoró de manera eficaz la absorción por parte de los núcleos de las células tumorales de la sustancia marcadora doxorrubicina. También se pudo demostrar que se alcanzaron estos dos efectos beneficiosos con la sustancia AF-6, también un fragmento de una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6). Los experimentos adicionales indicaron que AF-16 redujo la presión intracraneal elevada en ratones con un glioblastoma inducido de manera experimental, y también facilitó la absorción y unión de doxorrubicina en los núcleos de las células tumorales.

55 La presente invención, por lo tanto, describe por primera vez el uso de una proteína AF como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica y/o un alimento médico para el uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM), para el uso en el tratamiento sintomático, curativo y/o paliativo del glioblastoma.

La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional para el uso en el tratamiento del glioblastoma. En general, dicha sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional comprende un fármaco antineoplásico, radioterapia, sustancia antimicrobiana, sustancia antibiótica, y/o un fármaco dirigido a una lesión postraumática, neurodegeneración, y/o una afección inflamatoria.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, en combinación con una sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional para tratar el glioblastoma, en la que dicha sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional se selecciona del grupo que consiste en un fármaco antineoplásico, radioterapia, sustancia antibiótica, y un fármaco dirigido a una lesión postraumática, neurodegeneración, o una afección inflamatoria, como tal, y a su uso en medicina, en particular a su uso en el tratamiento del glioblastoma.

Además, dicha composición farmacéutica puede comprender, por supuesto, dos o más proteínas de factor antiselector (AF), fragmentos, derivados, o combinaciones de las mismas, así como comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En particular, la proteína AF y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína AF y/o homólogo y/o fragmento de la misma, se usan para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia farmacéutica adicional en forma de nanopartículas y/o formulaciones de las mismas en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM).

Por ejemplo, dicha sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional se puede seleccionar del grupo que consiste en un fármaco antineoplásico, un agente citostático, material genético, radioterapia, sustancia antimicrobiana, sustancia antibiótica, sustancia antiviral, compuesto inmunológicamente activo y un fármaco dirigido a una lesión postraumática, neurodegeneración, o una afección inflamatoria.

Además, dicha composición farmacéutica puede comprender dos o más proteínas de factor antiselector (AF) y/o homólogos y/o fragmentos de las mismas, y/o sales farmacéuticamente activas de las mismas, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida actualmente, una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, se demuestra que es capaz de superar las barreras celulares en las células malignas y/o patológicas en el glioblastoma, tal como un revestimiento de glucocáliz protector, y se puede usar por tanto como adyuvante para reducir una dosis necesaria de fármaco, de manera alternativa para maximizar el efecto de la dosis de dicha sustancia y/o formulación farmacéutica. En consecuencia, dicha proteína de factor antiselector (AF) anteriormente descrita como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o una composición farmacéutica que la comprende, se puede usar para minimizar los efectos secundarios tóxicos o indeseados de dicha sustancia y/o formulación farmacéutica en el tratamiento del glioblastoma.

Además, un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en la proteína de factor antiselector (AF) y/o homólogo y/o fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, se proporciona preferiblemente en forma de yema de huevo enriquecida en factores antisecretorios naturales.

Así, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en una proteína de factor antiselector (AF) y/o homólogo y/o fragmento de la misma como se describe en la presente memoria, tal como yema de huevo enriquecida en factores antisecretorios naturales, en combinación con un fármaco antineoplásico, tal como temozolomida, así como su uso general en medicina y, en particular, su uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM).

En otra realización igualmente preferida, una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, se puede producir de manera endógena por parte del paciente tras el consumo de un alimento y/o un alimento para uso alimenticio especial que induce la absorción, formación y/o liberación de una proteína de factor antiselector (AF).

La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una

actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional para tratar el glioblastoma. El AF y la sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional se pueden administrar juntas o en una sucesión alternante. Se pueden co-formular o administrar en formulaciones diferentes.

Una realización preferida actualmente de la presente invención es además el uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, para la fabricación de una composición farmacéutica para optimizar la radioterapia en el tratamiento del glioblastoma.

Además, basándose en la naturaleza transitoria y reversible de la reducción de la IFP celular, el médico puede idear fácilmente una rutina de administración en la que una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, se administra a intervalos de tiempo calculados de manera óptima que se ajustan de forma que la IFP de las células objetivo se reduce justo a tiempo para la administración de la sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional durante el régimen de tratamiento de un paciente de glioblastoma.

Así, otra realización igualmente preferida se refiere a un método o a un régimen de administración de dosis para la administración y/o absorción celular optimizadas de una sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional, en la que dicha sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional comprende un fármaco anti-neoplásico, radioterapia, sustancia antibiótica, y/o un fármaco dirigido a una lesión postraumática, neurodegeneración, o una afección inflamatoria, adecuados para el tratamiento del glioblastoma.

La proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, y la sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional se pueden administrar juntas o en sucesión alternante. Se pueden co-formular o administrar en formulaciones diferentes.

Una composición farmacéutica según la presente invención se puede formular para la administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica, y se puede destinar a la administración en forma de un espray, aerosol, y/o mediante un inhalador o nebulizador. La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar en un contexto mediante aplicación de manera tópica, localmente in situ, de manera oral, nasal, de manera subcutánea y/o sistémica a través de los vasos sanguíneos o a través del tracto respiratorio.

Cuando la composición farmacéutica y/o el alimento médico se formula para administración de manera sistémica en la sangre, el régimen de dosificación se selecciona a una dosis, p.ej., de AF-16 (SEQ ID N°:3) equivalente a 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000 µg por aplicación y kg de peso corporal y día, y dicha administración se lleva a cabo en forma de una única dosis o en forma de múltiples aplicaciones diarias.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), tal como SEQ ID N°: 1 (AF), SEQ ID N°: 2 (AF-6), SEQ ID N°:3 (AF-16), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma en combinación con un fármaco anti-neoplásico, tal como temozolomida, así como su uso general en medicina y, en particular, su uso en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para optimizar la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional para el tratamiento y/o la prevención del glioblastoma.

De nuevo, se prevé que diversas dosis y vías de administración sean adecuadas para el propósito deseado del tratamiento, así como la edad, sexo, afección del paciente, etc.

El intervalo muy amplio de regímenes de dosis eficaces utilizados indica que los riesgos de efectos secundarios y complicaciones inesperadas son mínimos. Así, la presente invención posibilitará el tratamiento de cargas excesivas en células y tejidos, así como para tratar a un paciente con un amplio intervalo de dosis que se ajustan a la respuesta individual y la gravedad de la enfermedad y/o la molestia.

La presente invención, además en un caso actualmente preferido, se refiere a un método para el diseño mejorado de fármacos caracterizado por ensayar la respuesta de células o tejidos sometidos a tratamiento de un glioblastoma hacia una sustancia o una formulación farmacéutica a la que se hace referencia en la presente solicitud, y estimar la influencia de una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, o combinaciones de las mismas sobre la absorción celular de dicha sustancia o formulación, p.ej., midiendo la cantidad de FAK fosforilada.

Cualquiera de los métodos anteriormente descritos se puede llevar a cabo en general de manera alternativa en un

sistema celular o en un organismo de ensayo. Los métodos también son igualmente aplicables a sistemas *in vivo*, *in situ*, e *in silico*.

Se conocen bien en la técnica métodos habituales:

- para el diseño mejorado de fármacos,

5 - para el cribado y/o evaluación de potenciales sustancias inhibitoras y/o estimuladoras de AF,

- para evaluar la eficacia y/o verificar la actividad funcional de proteínas de factor antiselector (AF) nuevas o conocidas, péptidos, derivados, homólogos, y/o fragmentos de las mismas, que tienen una actividad funcional equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de las mismas.

El factor antiselector

10 El factor antiselector es una clase de proteínas que se da de manera natural en el organismo. La proteína de factor antiselector humano AF es una proteína de 41 kDa, que comprende 382-288 aminoácidos cuando se aísla de la glándula hipófisis. El sitio activo con respecto al efecto beneficioso sobre el tratamiento del glioblastoma según la presente invención se puede localizar en la proteína en una región cercana al extremo N-terminal de la proteína, en particular localizada en los aminoácidos 1-163 de SEQ ID N° 1, de manera más específica en las posiciones de
15 aminoácidos 35 - 50 de la secuencia de la proteína de factor antiselector (AF). El efecto biológico de AF se ejerce mediante cualquier péptido o polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos, SEQ ID N°: 2 (AF-6), de dicha secuencia consenso, o una modificación de la misma que no altere la función del polipéptido y/o péptido.

Los presentes inventores han demostrado que el factor antiselector es hasta cierto punto homólogo a la proteína S5a/Rpn10, que constituye una subunidad de un constituyente predominante en todas las células, el proteosoma 26
20 S, de manera más específica en el extremo 19 S/PA 700. En la presente invención, las proteínas de factor antiselector (AF) se definen como una clase de proteínas homólogas que tienen las mismas propiedades funcionales. El factor antiselector también es muy similar a angiocidina, otra isoforma proteica que se sabe que se une a trombospondina-1 y está asociada a la progresión del cáncer.

25 Todos los homólogos, derivados y fragmentos de proteínas y/o péptidos de factor antiselector (AF) según la presente invención tienen una actividad biológica análoga. Los homólogos, derivados y fragmentos, en el presente contexto, comprenden al menos 6 aminoácidos (como se muestra en SEQ ID N°: 2) que corresponden a los de una proteína de factor antiselector (AF) natural, que se puede modificar además cambiando uno o más aminoácidos para optimizar la actividad biológica del factor antiselector, sin alterar la función esencial del polipéptido y/o péptido.

30 Por derivado se entiende en el presente contexto una proteína que tiene una actividad equivalente y/o una actividad funcional equivalente a un factor antiselector como se define en la presente memoria, que deriva de otra sustancia directamente o mediante modificación o sustitución parcial, en el que uno o más aminoácidos se han sustituido por otro aminoácido, cuyo aminoácido puede ser un aminoácido modificado o no natural. Por ejemplo, los derivados de factores antiselectores según la invención pueden comprender un grupo protector N-terminal y/o C-terminal. Un ejemplo de un grupo protector N-terminal incluye acetilo. Un ejemplo de un grupo protector C-terminal incluye amida.

35 Además, cualquier secuencia de aminoácidos que sea al menos un 70% idéntica, tal como al menos un 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína de factor antiselector (AF), péptido, homólogo, derivado y/o fragmento según la invención, también se considera que se halla dentro del alcance de la presente invención.

40 Por proteínas, homólogos, derivados, péptidos y/o fragmentos de las mismas que tienen una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos, p.ej. del péptido, es idéntica a la secuencia de referencia, excepto porque la secuencia de aminoácidos puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta un 5% de los aminoácidos de la
45 secuencia de referencia pueden estar delecionados o sustituidos con otros aminoácidos, o varios aminoácidos hasta un 5% de los aminoácidos totales de la secuencia de referencia pueden estar insertados en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia se pueden dar en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos
50 dentro de la secuencia de referencia.

En la presente invención, un programa de algoritmo local es el más adecuado para determinar la identidad. Los programas de algoritmo local, (tales como Smith Waterman) comparan una subsecuencia de una secuencia con una subsecuencia de una segunda secuencia, y hallan la combinación de subsecuencias y la alineación de esas subsecuencias, lo que produce la puntuación de similitud total más alta. Los huecos internos, si se permiten, se penalizan. Los algoritmos locales funcionan bien para comparar dos proteínas multidominio, que tienen un único
55 dominio, o solo un sitio de unión en común.

Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete informático GCG (Devereux, J et al (1994)) BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al, Altschul, S.F. et al (1990)). Cada programa de análisis de secuencias tiene una matriz de puntuación por defecto y penalizaciones por huecos por defecto. En general, se esperaría que un biólogo molecular usase los ajustes por defecto establecidos por el programa informático usado.

Las proteínas de factor antiselector (AF), o un péptido o un homólogo, derivado y/o fragmento de las mismas que tienen una actividad equivalente como se define en la presente memoria, pueden comprender 6 aminoácidos o más, tal como 6-16 aminoácidos, tal como 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos o más. En otras realizaciones preferidas, el factor antiselector consiste en 42, 43, 45, 46, 51, 80, 128, 129 o 163 aminoácidos. En las realizaciones preferidas, la proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, consiste en 6, 7, 8 o 16 aminoácidos.

En otra realización preferida, una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, consiste en una secuencia de aminoácidos según las fórmulas siguientes:

X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5, en la que X1 es I, los aminoácidos 1-35 de SEQ ID N° 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de SEQ ID N° 6, o está ausente.

La proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, se puede producir *in vivo* o *in vitro*, p.ej. de manera recombinante, sintetizada de manera sintética y/o química, y/o aislarla a partir de una fuente natural de factores antiselectores, tal como a partir de glándulas hipófisis de cerdo o huevos de ave. Tras la producción, la proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, se puede procesar adicionalmente, tal como mediante escisión química o enzimática hasta fragmentos activos antiselectores más pequeños o mediante modificación de aminoácidos. En la actualidad no es posible obtener la proteína de factor antiselector (AF) en forma pura mediante purificación. Sin embargo, es posible producir una proteína de factor antiselector biológicamente activa de manera recombinante o sintética como se describió previamente en los documentos WO 97/08202 y WO 05/030246. El documento WO 97/08202 también describe la producción de fragmentos biológicamente activos de esta proteína de 7-80 aminoácidos.

La proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, puede comprender adicionalmente un grupo protector N-terminal y/o C-terminal. Un ejemplo de un grupo protector N-terminal incluye acetilo. Un ejemplo de un grupo protector C-terminal incluye amida.

En una realización preferida de la presente invención, la proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, según la presente invención, se selecciona de SEQ ID N° 1-6, es decir, VCHSKTRSNPENNVL (SEQ ID N° 3, en este contexto también denominada AF-16), IVCHSKTR (SEQ ID N° 5), VCHSKTR (SEQ ID N° 4), CHSKTR (SEQ ID N° 2), HSKTR (SEQ ID N° 6), o la secuencia de aminoácidos de una proteína de factor antiselector (AF) según SEQ ID N° 1 mediante el uso de las abreviaturas de una letra comunes para los aminoácidos. Se han descrito previamente, p.ej., en el documento WO 05/030246. Como se especifica en la lista de secuencias adjunta, algunos de los aminoácidos de las secuencias anteriormente especificadas se pueden sustituir por otros aminoácidos. Más adelante en este párrafo, la posición de un aminoácido particular de una secuencia de aminoácidos particular se calcula desde la izquierda, indicando el aminoácido N-terminal en la posición 1 en esa secuencia particular. Se puede(n) llevar a cabo cualquier sustitución(es) de aminoácido(s) tal como se especifica(n) más adelante independientemente de otra(s) sustitución(es) de aminoácido(s) en esa secuencia. En SEQ ID N° 3, la C de la posición 2 se puede sustituir por S, la H de la posición 3 se puede sustituir por R o K, la S de la posición 4 se puede sustituir por L, y/o la T de la posición 6 se puede sustituir por A. En SEQ ID N° 5, la C de la posición 3 se puede sustituir por S, la H de la posición 4 se puede sustituir por R o K, la S de la posición 5 se puede sustituir por L, y/o la T de la posición 7 se puede sustituir por A. En SEQ ID N° 4, la C de la posición 2 se puede sustituir por S, la H de la posición 3 se puede sustituir por R o K, la S de la posición 4 se puede sustituir por L, y/o la T de la posición 6 se puede sustituir por A. En SEQ ID N° 2, la C de la posición 1 se puede sustituir por S, la H de la posición 2 se puede sustituir por R o K, la S de la posición 3 se puede sustituir por L, y/o la T de la posición 5 se puede sustituir por A. En SEQ ID N° 6, la H de la posición 1 se puede sustituir por R o K, la S de la posición 2 se puede sustituir por L, y/o la T de la posición 4 se puede sustituir por A.

La presente invención también prevé la combinación de dos o más de cualquiera de los fragmentos según SEQ ID N° 1-6.

Las proteínas o péptidos de factor antiselector (AF) específicas a usar según y/o que están incluidas en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en una proteína de factor antiselector (AF) que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 1, una proteína de factor antiselector (AF) que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2, una proteína de factor antiselector (AF) que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 3, una proteína de factor antiselector (AF) que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 4, y una proteína

de factor antisecretor (AF) que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 5.

Además, en otra realización, la invención está relacionada con el uso de una proteína de factor antisecretor (AF) que es una proteína con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°:1, o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 37-42 de SEQ ID N°:1.

- 5 En otra realización, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica tal como se describe en la presente memoria, que comprende dos o más proteínas de factor antisecretor (AF) seleccionadas de las proteínas descritas en SEQ ID N°: 1-6, y SEQ ID N° 1 o un homólogo, derivado y/o fragmento de las mismas que comprenden los aminoácidos 37-42 de SEQ ID N° 1, o una secuencia descrita mediante las fórmulas generales descritas en la presente memoria. Dichas secuencias son igualmente preferidas para el uso en la presente invención.
- 10 El documento WO 00/038535 describe productos alimenticios, enriquecidos en proteínas de factor antisecretor (AF) como tal, que son ejemplos para alimentos, productos alimenticios y/o suplementos alimenticios adecuados para el uso en el presente contexto.

Composición farmacéutica

- 15 En un caso de la presente invención, la composición farmacéutica según la invención comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La persona experta puede determinar fácilmente mediante experimentación la elección del excipiente farmacéuticamente aceptable y su concentración óptima para el uso según la presente invención. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso según la presente invención incluyen disolventes, agentes tamponadores, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, y estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o diluyentes. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional, p.ej. según "Remington: The science and practice of pharmacy", 21ª edición, ISBN 0-7817-4673-6 o "Encyclopedia of pharmaceutical technology", 2ª edición, ed. Swarbrick J., ISBN: 0-8247-2152-7. Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que es sustancialmente inocua para el individuo al que se va a administrar la composición. Tal excipiente cumple normalmente los requerimientos planteados por las autoridades sanitarias nacionales. Las farmacopeas oficiales, tales como, p.ej., la Farmacopea Británica, la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Europea fijan las normas para los excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20
- 25

- 30 Lo siguiente es una revisión de las composiciones relevantes para el uso opcional en una composición farmacéutica según la invención. La revisión se basa en la vía de administración particular. Sin embargo, se aprecia que en los casos en los que se puede emplear un excipiente farmacéuticamente aceptable en las diferentes formas o composiciones farmacéuticas, la aplicación de un excipiente farmacéuticamente aceptable particular no se limita a una forma farmacéutica particular o una función particular del excipiente. Se debería recalcar que la invención no se limita al uso de las composiciones mencionadas a continuación.

Composiciones parenterales:

- 35 Para la aplicación sistémica, las composiciones según la invención pueden contener vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables atóxicos convencionales, que incluyen las microesferas y liposomas.

Las composiciones para el uso según la invención pueden incluir todos los tipos de composiciones sólidas, semisólidas y líquidas.

- 40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir disolventes, agentes tamponadores, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, y estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o diluyentes. Los ejemplos de los diferentes agentes se proporcionan más adelante.

Ejemplos de diversos agentes:

Los ejemplos de disolventes incluyen, pero sin limitación, agua, alcoholes, sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico y linfa.

- 45 Los ejemplos de agentes tamponadores incluyen, pero sin limitación, ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido fosfórico, bicarbonatos, fosfatos, dietilamida, etc.

Los ejemplos de agentes quelantes incluyen, pero sin limitación, EDTA y ácido cítrico.

Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero sin limitación, hidroxil anisol butilado (BHA), ácido ascórbico y derivados del mismo, tocoferol y derivados del mismo, cisteína, y mezclas de los mismos.

- 50 Los ejemplos de diluyentes y agentes disgregantes incluyen, pero sin limitación, lactosa, sacarosa, Emdex, fosfatos cálcicos, carbonato cálcico, sulfato cálcico, manitol, almidones y celulosa microcristalina.

Los ejemplos de agentes aglutinantes incluyen, pero sin limitación, sacarosa, sorbitol, goma arábiga, alginato sódico, gelatina, quitosano, almidones, celulosa, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona

y polietilenglicol.

La composición farmacéutica según la invención, en un contexto, se puede administrar de manera local o por medio de infusión periférica intravenosa o inyección intramuscular o subcutánea al paciente, o por vía bucal, pulmonar, nasal, cutánea u oral. Además, también es posible administrar la composición farmacéutica a través de una derivación insertada quirúrgicamente en un ventrículo cerebral del paciente.

En una realización, la composición farmacéutica usada según la presente invención se formula para la administración intraocular, local, intranasal, oral, subcutánea y/o sistémica. La vía de administración elegida variará dependiendo de la afección del paciente a tratar y de la edad y sexo del paciente, etc.

En una realización preferida, la composición de la invención se administra mediante aplicación en forma de una suspensión o, aún más preferiblemente, un polvo para inhalación con un spray, aerosol, inhalador o nebulizador de manera nasal, y/o en el tracto respiratorio.

La administración de un polvo que comprende factores antiseoretos tiene ventajas adicionales con respecto a la estabilidad y dosis. Una composición farmacéutica según la invención también se puede aplicar de manera tópica, ocular, nasal, oral, subcutánea, y/o se puede administrar de manera sistémica a través de los vasos sanguíneos. En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para la administración intravenosa, intramuscular, local, oral o nasal. En general, cuando se usa para la aplicación tópica en el ojo, la concentración aplicada en la composición de la invención es de 1 µg a 1 mg por aplicación, preferiblemente 50 - 500 µg, en forma de una única dosis al día o varias veces al día (dosis múltiples), pero no se limita a estas.

Al aplicarla de manera sistémica en la sangre, la dosis está dentro del intervalo de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal, tal como 0,1 µg a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal, preferiblemente 1 - 500, tal como 1 - 1000 µg/kg de peso corporal. Cuando se usa yema de huevo enriquecida en los factores antiseoretos según la presente invención, esta formulación se administra preferiblemente de manera oral.

En un caso de la invención, dicha composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal excipiente puede ser cualquier excipiente preferible elegido para que sea adecuado para el propósito específico. En la presente memoria se describen ejemplos de excipientes.

Método para tratar el glioblastoma

En una realización, la presente invención se refiere a tratar el glioblastoma, caracterizado por administrar una proteína de factor antisecretor (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma a un paciente que lo necesita. Dicho tratamiento, en una realización de la presente invención, se puede usar para facilitar una absorción optimizada del fármaco y la administración de una sustancia farmacéutica adicional.

Dicho tratamiento de un mamífero que padece un glioblastoma puede comprender, en una realización preferida actualmente, proporcionar un alimento, producto alimenticio y/o suplemento alimenticio a dicho paciente, y de ese modo inducir la producción endógena de AF para facilitar una absorción optimizada del fármaco y la administración de una sustancia farmacéutica adicional.

Dicha sustancia y/o formulación farmacéutica se selecciona en el presente contexto del grupo que consiste en un fármaco antineoplásico, fármaco antitumoral, radioterapia, sustancias y/o células inmunológicas y sustancias antibióticas, un fármaco dirigido a una lesión postraumática, un fármaco dirigido a la neurodegeneración, y un fármaco contra afecciones inflamatorias. Dicha sustancia farmacéutica adicional puede estar en forma de nanopartículas y/o formulaciones de las mismas en el tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM).

Los ejemplos bien conocidos en el campo se seleccionan, pero sin limitación, del grupo que comprende un agente alquilante, tal como temozolomida (Maity et al., 2008; Kaye y Laws, 2012) y Gliadel®, que es una oblea implantable de carmustina alquilante. Además, se incorporan anticuerpos hacia el factor de crecimiento endotelial vascular.

En otra realización igualmente preferida, dicho método para el tratamiento de un mamífero que padece un glioblastoma puede comprender proporcionar una yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos a dicho paciente, y de ese modo optimizar la absorción del fármaco y la administración de una sustancia farmacéutica adicional.

La presente invención se refiere al tratamiento del glioblastoma (un tumor de GBM) y/o a la optimización de la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica, tal como un fármaco antineoplásico, radioterapia, terapia basada en mecanismos inmunológicos o una administración de un gen a una célula tumoral de glioblastoma, caracterizado por la administración de una proteína de factor antisecretor (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma a un paciente que lo necesita.

La presente solicitud describe por primera vez medios y/o una aproximación eficaz buscados durante mucho tiempo para el tratamiento de tumores de GBM. Sorprendentemente se describen las terapias sintomáticas, curativas y paliativas para el glioblastoma, caracterizadas por la administración de una proteína de factor antiseoretor (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y

5 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma a un paciente que lo necesita. En particular, se pueden usar para optimizar la administración de fármacos y de genes, así como la quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia en el tratamiento del glioblastoma.

10 En particular, se describen métodos para optimizar la circulación sanguínea y/o la tensión de oxígeno en un tumor de GBM, lo que facilita los efectos de la radioterapia así como de la terapia inmunitaria, y métodos para facilitar una absorción optimizada de fármacos y la administración de temozolomida opcionalmente en combinación con radiación a una célula tumoral de GBM.

15 Se describen métodos para reducir la dosis de fármaco necesaria, de manera alternativa para maximizar el efecto de la dosis de dicha sustancia y/o formulación farmacéutica, caracterizados por la administración de una proteína de factor antiseoretor (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma a un paciente que lo necesita, que se usan para minimizar los efectos secundarios tóxicos o indeseados de dicha sustancia y/o formulación farmacéutica en el tratamiento del glioblastoma.

20 Un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en la proteína de factor antiseoretor (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, se proporciona preferiblemente en forma de yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos naturales.

El AF y la sustancia y/o formulación farmacéutica segunda o adicional se pueden administrar juntas o en una sucesión alternante. Se pueden co-formular o administrar en formulaciones diferentes.

25 Se prevé un método para optimizar la radioterapia en el tratamiento del glioblastoma, caracterizado por administrar una proteína de factor antiseoretor (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma a un paciente que lo necesita.

Sección experimental

30 Ejemplo 1

AF-16 (SEQ ID N°: 3)

35 El objetivo de este experimento fue investigar si la administración del péptido AF-16 redujo la presión intracraneal elevada predominante en un cerebro con un glioblastoma. Si fuera así, se podrían contrarrestar los efectos perjudiciales del edema cerebral inducido por el tumor y la presión intracraneal elevada, un efecto muy beneficioso y deseado.

Se adquirieron ratas Fischer 344 macho adultas de Charles River, Alemania. El peso corporal en el momento de los experimentos fue 230-250 g. Los animales tuvieron agua y alimento granulado a voluntad. El permiso para los experimentos lo concedió el *Comité Ético Regional de Experimentos con Animales*, y se siguió la normativa nacional y de la UE.

40 Se depositaron de manera estereotáctica células cultivadas de la línea celular establecida de glioma RG2, clon N32, en el estriado derecho del cerebro de ratas Fischer 344 adultas (A.T. Aas, A Brun, C. Blennow, S. Strömlund y L.G. Salford (1995). The RG2 glioma model. J. Neuro-Oncology 23, 175-183; R. F. Barth y B. Kauer (1999). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. (J Neuro-Oncology 94, 299-312). Después de 18 - 22 días, un tumor, que cumplía los criterios establecidos del glioblastoma, fue demostrable en el hemisferio derecho, e invadía el parénquima cerebral adyacente (Figs. 1, 2). Se describió que las células del tumor, intensamente vascularizado, estaban delimitadas por un glucocáliz, es decir, una capa fina de polisacáridos y proteoglicanos, como se revela en la Fig. 3. El tumor en expansión agrandó el tejido cerebral, lo que provocó un incremento de la presión intracraneal debido a que el cráneo óseo no permitió ninguna expansión de volumen. La Fig. 4 muestra la implantación de sensores de presión (Samba 3200; Samba Sensors AB, V. Frölunda, Suecia), uno en cada hemisferio. Se midió la presión intracraneal, y estuvo en el intervalo de 25 - 50 mm Hg (Fig. 4), lo que significa que estuvo sorprendentemente elevada en comparación con la normal, $5,3 \pm 2,1$ mm Hg (H.-A. Hansson, M. Al-Olaima, E. Jennische, K. Gatzinsky y S. Lange (2012). The peptide AF-16 and the AF protein counteract intracranial hypertension. Acta Neurochir. Suppl. 114, 377-382). Finalmente, la presión intracraneal superó 50 - 60 mm Hg, lo que dio como resultado la hernia del cerebro, dislocaciones y circulación sanguínea

55 dificultada, y la muerte (Fig. 5).

Una única instilación nasal de 10 µL de una disolución del péptido AF-16 (1- 4 mg/kg de peso corporal) en agua dio como resultado, en 15 - 30 minutos, una reducción de la presión intracraneal elevada hasta un nivel aceptable, alrededor de 20 mm Hg o menos (Fig. 6). La presión intracraneal se elevó tanto en el lado derecho afectado por el tumor como en el lado izquierdo contralateral, y la presión cayó en el mismo grado en ambos hemisferios cerebrales.

5 De manera concomitante, se solucionó cualquier deterioro neurológico demostrable.

Se concluye que el péptido AF-16, en 15 - 30 minutos, contrarrestó la elevación por otra parte demostrable de la presión intracraneal en ratas adultas con un tumor de glioblastoma inducido de manera experimental. Los efectos beneficiosos duraron al menos 4-6 h.

Ejemplo 2

10 AF-6 (SEQ ID N°: 2)

El objetivo de este experimento fue investigar si la administración del péptido AF-6 redujo la presión intracraneal elevada predominante en un cerebro con un glioblastoma. Si fuera así, se podrían contrarrestar los efectos perjudiciales del edema cerebral inducido por el tumor y la presión intracraneal elevada, un efecto muy beneficioso y deseado.

15 Se adquirieron ratas Fischer 344 macho adultas de Charles River, Alemania. El peso corporal en el momento de los experimentos fue 230-250 g. Los animales tuvieron agua y alimento granulado a voluntad. El permiso para los experimentos lo concedió el *Comité Ético Regional de Experimentos con Animales*, y se siguieron la normativa nacional y de la UE.

20 Se depositaron de manera estereotáctica células cultivadas de la línea celular establecida de glioma RG2, clon N32, en el estriado derecho del cerebro de ratas Fischer 344 adultas como se describió en el *Ejemplo 1*. Después de 18 - 22 días, un tumor, que cumplía los criterios establecidos del glioblastoma, fue demostrable en el hemisferio derecho, e invadía el parénquima cerebral adyacente.

25 Se instiló una única dosis del péptido AF-6 (1-2 mg/kg de peso corporal, disuelto en agua) en la nariz de una rata Fischer con un tumor de glioblastoma experimental de origen RG2-N32 en el día 21 tras la implantación. Alrededor de 15 min más tarde la presión intracraneal comenzó a caer desde 25 - 27 mm Hg hasta 17,7 mm Hg (Fig. 7).

Se concluye que el péptido AF-6 redujo la presión intracraneal elevada provocada por un tumor de glioblastoma implantado hasta un nivel aceptable, de alrededor de 20 mm Hg o menos. No se pudieron describir efectos secundarios.

Ejemplo 3

30 AF-6 (SEQ ID N°: 2)

El objetivo de este experimento fue investigar si la administración del péptido AF-16 redujo la presión intracraneal elevada predominante en un cerebro de ratón con un glioblastoma. Si fuera así, se podrían contrarrestar los efectos perjudiciales del edema cerebral inducido por el tumor y la presión intracraneal elevada, un efecto muy beneficioso y deseado.

35 Se adquirieron ratones C57/Bl/6 adultos de B & K, Sollentuna, Suecia. El peso corporal fue 23 g, y los animales tuvieron agua y alimento granulado a voluntad. El permiso para los experimentos lo concedió el *Comité Ético Regional de Experimentos con Animales*, y se siguieron la normativa nacional y de la UE.

40 La línea celular GL261 de glioma de ratón fue de origen C57Bl/6, y se cultivó en el laboratorio Rausing, BMC, Universidad de Lund, según un protocolo establecido (*K. Enell Smith, S. Fritzell, W. Badn, S. Eberstål, S. Janelidze, E. Visse, A. Darabi y P. Siesjö* (2008). Cure of established GL261 mouse gliomas after combined immunotherapy with GM-CSF and IFN γ is mediated by both CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cells. *Int. J. Cancer* 124, 630-637).

45 A cada uno de los ratones C57/Bl/6 se les depositaron de manera estereotáctica 5.000 células de glioma GL261 en 5 µL de medio de cultivo de tejidos en la estructura cerebral profunda en el hemisferio cerebral derecho. Se formó un tumor en expansión y 22 días más tarde tuvo un diámetro de 3-5 mm. El animal no mostró signos evidentes de enfermedad o alteración motora al seleccionarlo para el uso experimental.

Se seleccionó el péptido AF-6 de seis AA (SEQ ID N°:2) (fabricado mediante síntesis en fase sólida por KJ Ross-Petersen ApS, Copenhague, con una pureza >95 % y TFA como contraión) para investigar su capacidad de reducir la presión intracraneal incrementada (ICP) que aparece inevitablemente en esta etapa del desarrollo del tumor.

50 Se anestesió un ratón con un tumor GL261 en el hemisferio cerebral derecho con isoflurano y se colocó en un soporte estereotáctico. Se realizó una incisión en la piel de la bóveda craneal, y se retiró el tejido blando. Se taladraron dos orificios, cada uno de un diámetro de 1 mm, en los huesos parietales derecho e izquierdo. Se insertó un transductor de presión de fibra óptica en miniatura a través de cada orificio en el hueso craneal en el tejido cerebral, se conectó a un equipo de medición de la presión Samba 3200 (Samba; Samba Sensors AB, V. Frölunda,

Suecia) y a un ordenador. Los sensores se calibraron antes y después de cada sesión de medición.

Al ratón anestesiado se le instilaron 5 µL de un péptido de 6 aminoácidos, AF-6, disuelto en agua destilada, en cada orificio nasal mientras el animal estaba boca arriba. La dosis fue de 5 mg por kg de peso corporal. A continuación comenzó el registro continuo de la presión en cada hemisferio. La presión inicial del líquido intersticial (IFP) en el hemisferio derecho del tumor fue 23 mm Hg, y la ICP en el hemisferio izquierdo fue 19 mm Hg, lo que contrasta con la ICP en un ratón de control normal, alrededor de 6 mm Hg. Tanto la IFP como la ICP comenzaron a disminuir después de alrededor de 15 minutos. A los 45 min tras la instilación nasal de AF-6, la IFP en el hemisferio derecho del tumor fue 7 mm Hg, mientras la IFP fue 4 - 5 mm Hg en el hemisferio izquierdo. No se observaron efectos secundarios.

Se concluye que la instilación nasal del péptido AF-6 redujo la presión intracraneal elevada que se desarrolla en un tumor cerebral experimental unilateral no solamente en el hemisferio que alberga el tumor, sino también en el hemisferio contralateral. Esto significa que AF-6 fue eficaz para contrarrestar los patrones complejos de presión elevada que se desarrollan en los cerebros con un tumor en expansión.

Ejemplo 4

AF-16 (SEQ ID N°:3)

El objetivo de este experimento fue investigar si el tratamiento con AF-16 incrementó la penetración de un marcador a través de la membrana de las células tumorales, y la entrada y distribución posterior en sus núcleos. Se seleccionó doxorubicina como marcador, ya que es un fármaco citotóxico establecido con una masa molecular de 543,52 g/mol, es decir, se considera una sustancia de masa molecular bastante baja. Además, la doxorubicina es de color rojo, y cuando se expone a la luz emite una fluorescencia roja. La doxorubicina se intercala intensamente en el ADN en los núcleos celulares. Esto significa que si se observa una fluorescencia roja en un núcleo celular, el marcador ha alcanzado su objetivo, las células tumorales. Se sabe que las células de glioblastoma, tanto en seres humanos como en animales, impiden la entrada de sustancias quimioterápicas a las células tumorales, y por lo tanto no se alcanzan los efectos beneficiosos. La barrera más importante para el fármaco predomina en la superficie de las células tumorales.

Se adquirieron ratas Fischer 344 macho adultas de Charles River, Alemania. El peso corporal en el momento de los experimentos fue 230-250 g. Los animales tuvieron agua y alimento granulado a voluntad. El permiso para los experimentos lo concedió el *Comité Ético Regional de Experimentos con Animales*, y se siguieron la normativa nacional y de la UE.

Se depositaron de manera estereotáctica células cultivadas de la línea celular establecida de glioma RG2, clon N32, en el estriado derecho del cerebro de ratas Fischer 344 adultas como se describió en el *Ejemplo 1*. Después de 20 días, un tumor, que cumplía los criterios establecidos para ser un glioblastoma, estuvo presente en el hemisferio cerebral derecho de cada rata.

Se instiló AF-16, 1 mg por kg de peso corporal, disuelto en agua y administrado como una única dosis en un volumen de 10 µL, en los orificios nasales de ratas Fischer anestesiadas. Una hora más tarde, se administró a cada animal una inyección intravenosa del marcador doxorubicina (Sigma) a una dosis de 10 mg por kg de peso corporal, y finalmente se sacrificó 30 min más tarde. Se prepararon cortes de microtomo en criostato de los cerebros, y se examinaron con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia de los cortes de los cerebros de rata con glioblastoma y tratados mediante administración nasal del vehículo, agua, antes de la inyección del marcador doxorubicina mostró solamente unos pocos núcleos rojos dispersos (Fig. 8). Esto significa que muy pocas moléculas de doxorubicina entraron en las células tumorales.

En contraste, el pretratamiento con AF-16 de las ratas con glioblastoma antes de la administración de doxorubicina dio como resultado una tinción roja intensa de los núcleos de las células tumorales, y además una gran proporción de estas células estuvieron marcadas (Fig. 9).

Se concluye que la administración de los péptidos AF mejoró sorprendentemente la absorción de un marcador para un fármaco citotóxico, y facilitó su distribución en las células y la intercalación o unión del compuesto al ADN. Así, los péptidos AF mejoraron el acceso de los agentes quimioterápicos a su objetivo, las células tumorales.

Referencias

1. Lange, S., y Lönnroth, I. 2001. The antiseptory factor: synthesis, anatomical and cellular distribution, and biological action in experimental and clinical studies. *Int. Rev. Cytol.* 210, 39-75.
2. H.-A. Hansson, M. Al-Olama, E. Jennische, K. Gatzinsky y S. Lange (2012). The peptide AF-16 and the AF protein counteract intracranial hypertension. *Acta Neurochir. Suppl.* 114, 377-382).
3. K. Enell Smith, S. Fritzell, W. Badn, S. Eberstål, S. Janelidze, E. Visse, A. Darabi y P. Siesjö (2008). Cure of

established GL261 mouse gliomas after combined immunotherapy with GM-CSF and IFN γ is mediated by both CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cells. Int. J. Cancer 124, 630-637).

4. A.T. Aas, A Brun, C. Blennow, S. Strömblad y L.G. Salford (1995). The RG2 glioma model. J. Neuro-Oncology 23, 175-183;
- 5 5. R. F. Barth y B. Kauer (2009). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. J Neuro-Oncology 94, 299-312.
6. Remington: The science and practice of pharmacy", 21^a edición, ISBN 0-7817-4673-6 o "Encyclopedia of pharmaceutical technology", 2^a edición, ed. Swarbrick J., ISBN: 0-8247-2152-7.
7. WO 97/08202;
- 10 8. WO 05/030246
9. WO 97/08202
10. WO 97/08202
11. WO 98/21978
12. WO 00/038535.
- 15 13. WO 05/030246
14. WO 07/126364
15. WO 07/126363
16. WO 07/126365
17. WO 2010/093324

20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lantmännen AS Faktor AB

5 <120> Uso del factor antiseoretor (AF) en el tratamiento del glioblastoma

<130> PS54487PC00

<160> 6

10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 382

15 <212> PRT

<213> humano

<400> 1

```

Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser Glu Tyr Met
1      5      10      15
Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Gln Ala Gln Gln Asp Ala
20      25      30
Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn
35      40      45
Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu Thr Thr Leu
50      55      60
Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr Val Gln Pro
65      70      75      80
Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala His Leu Ala
85      90      95
Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile Ile Ala Phe
100     105     110
Val Gly Ser Pro Val Glu Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val Lys Leu Ala
115     120     125
Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile Asn Phe Gly
130     135     140
Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val Asn Thr Leu
145     150     155     160
Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val Pro Pro Gly
165     170     175
Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu Ala Gly Glu
180     185     190
Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu Phe Gly Val
195     200     205
Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Met
210     215     220
Glu Glu Gln Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala
225     230     235     240
Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu Asp Ser Asp
245     250     255
Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Ser Gln Gln Glu Phe Gly Arg Thr
260     265     270
Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Met Thr Glu Glu Glu Gln Ile Ala Tyr
275     280     285
Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu Ser
290     295     300
Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala Lys
305     310     315     320
Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln Ser
325     330     335
Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile Arg
340     345     350
Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg Arg
355     360     365
Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys Gly
370     375     380

```

<210> 2

<211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> se puede reemplazar con A

10 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> se puede reemplazar con R o K

15 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> se puede reemplazar con L

20 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> se puede reemplazar con S

<400> 2
 Cys His Ser Lys Thr Arg
 1 5

25 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> se puede reemplazar con A

35 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> se puede reemplazar con R o K

40 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> se puede reemplazar con L

45 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> se puede reemplazar con S

<400> 3
 Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn Val Gly Leu
 1 5 10 15

50 <400> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> se puede reemplazar con A

60 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> se puede reemplazar con R o K

<221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> se puede reemplazar con L

5 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> se puede reemplazar con S
 <400> 4
 Val Cys His Ser Lys Thr Arg
 1 5
 <210> 5
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> 7
 <223> se puede reemplazar con A
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 20 <223> se puede reemplazar con R o K
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> se puede reemplazar con L
 25 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> se puede reemplazar con S
 30 <400> 5
 Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220> Péptido activo
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 40 <223> se puede reemplazar con R o K
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> se puede reemplazar con L
 45 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> se puede reemplazar con A
 50 <400> 6
 His Ser Lys Thr Arg
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma, para el uso en el tratamiento del glioblastoma.
2. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según la reivindicación 1, en la que el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en terapia curativa de glioblastoma, terapia sintomática de glioblastoma, terapia paliativa de glioblastoma, optimización de la circulación sanguínea y/o tensión de oxígeno en un tumor de GBM, y optimización de la administración y/o absorción celular de una sustancia y/o formulación farmacéutica adicional y/o la administración de un gen en el tratamiento del glioblastoma.
3. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según la reivindicación 2, en la que dicha sustancia y/o formulación farmacéutica adicional se selecciona del grupo que consiste en un fármaco antineoplásico, un agente citostático, material genético, radioterapia, sustancia antimicrobiana, sustancia antibiótica, y una sustancia antiviral.
4. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se formula en una composición farmacéutica que comprende dos o más proteínas de factor antiselector (AF) y/u homólogos y/o fragmentos de la misma y/o sales farmacéuticamente activas de la misma.
5. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición farmacéutica se formula para administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica.
6. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición farmacéutica se formula para la administración en forma de un spray, aerosol, inhalador y/o mediante un nebulizador.
7. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición farmacéutica y/o alimento médico se formula para la administración de manera sistémica en la sangre a una dosis de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000 µg por aplicación y kg de peso corporal y día, y en la que dicha administración se lleva a cabo en forma de una única dosis o en forma de múltiples aplicaciones diarias.
8. Una proteína de factor antiselector (AF) y/o un homólogo y/o fragmento de la misma y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, y/o un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en dicha proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en la proteína de factor antiselector (AF) y/u homólogo y/o fragmento de la misma según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, se proporciona en forma de yema de huevo enriquecida en factores antisecretorios.
9. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma en combinación con temozolomida.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el fragmento de una proteína de factor antiselector (AF) es AF-16 (SEQ ID N°:3) o AF-6 (SEQ ID N°:2).
11. Una composición farmacéutica que comprende un alimento y/o suplemento alimenticio, enriquecido en una proteína de factor antiselector (AF) como se muestra en SEQ ID N°: 1 (AF), y/o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad equivalente y que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en

SEQ ID N°: 2 (AF-6), y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, en combinación con temozolomida.

12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que el alimento y/o suplemento alimenticio es yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos naturales (NASPs).

13. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10-13 para el uso en medicina.

5 14. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10-13 para el uso en el tratamiento del glioblastoma.

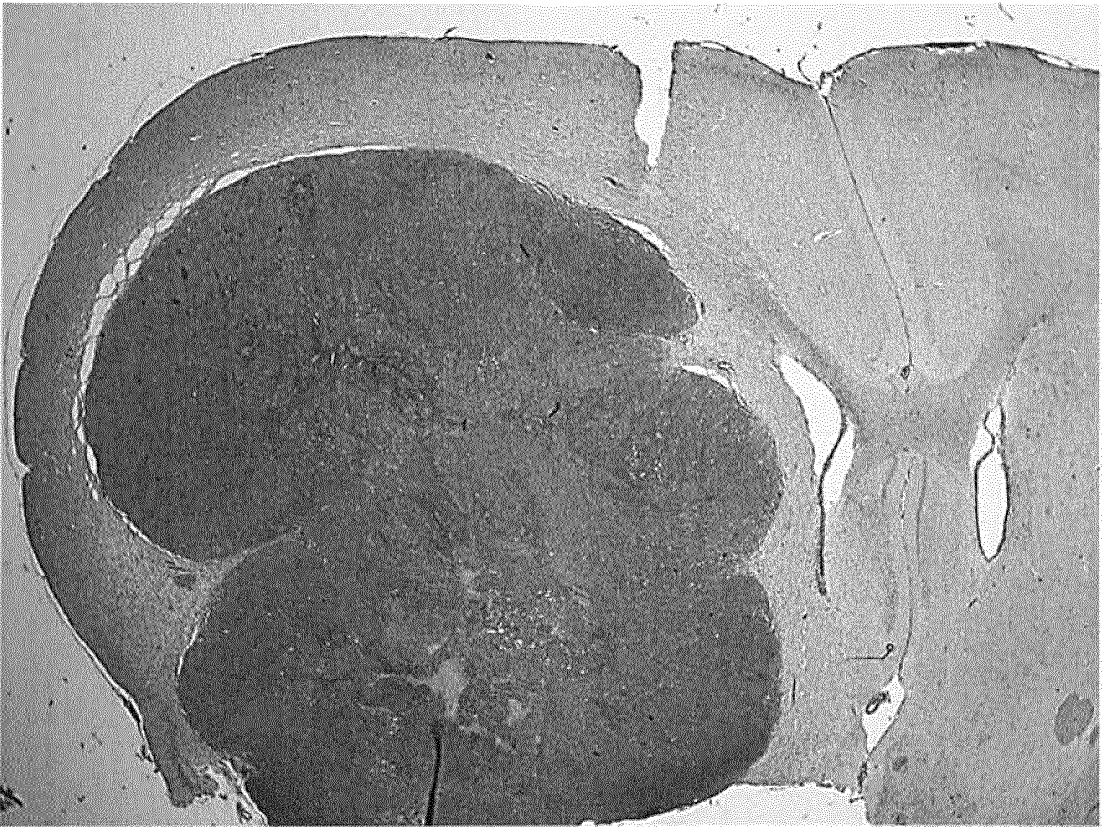


Fig.1

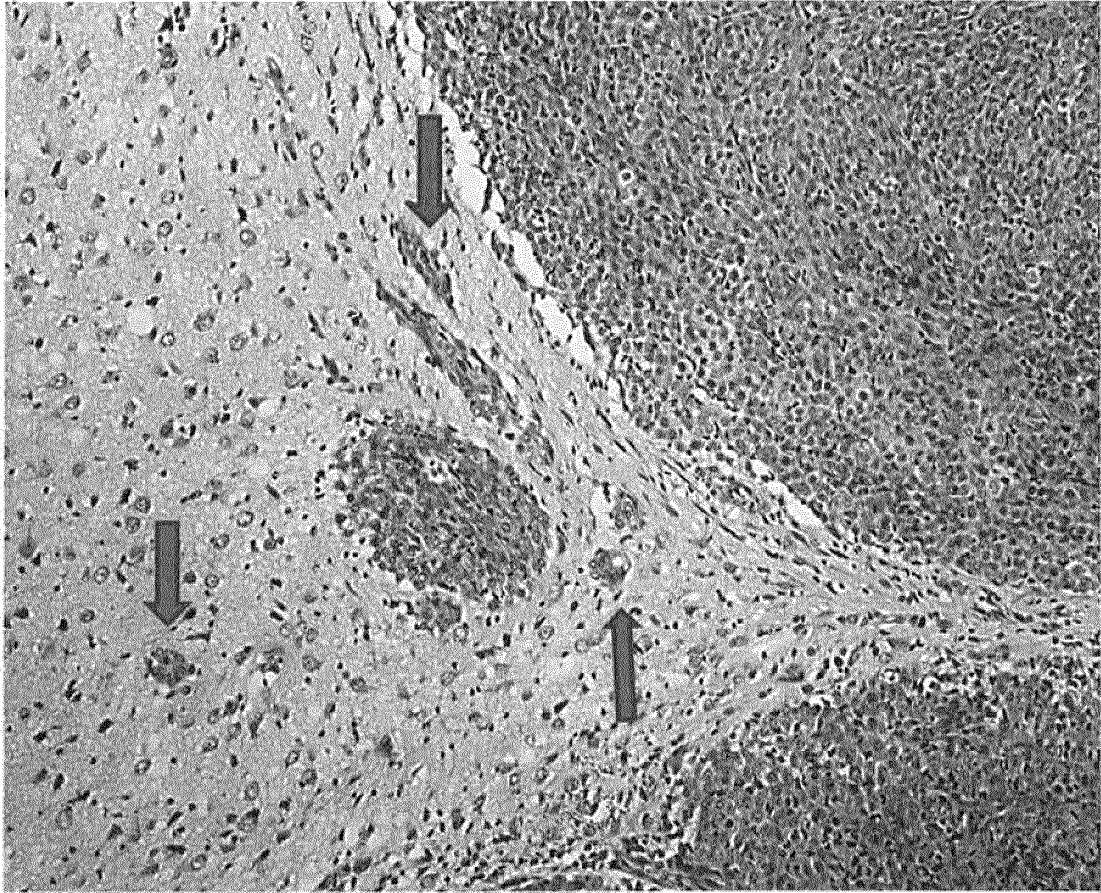


Fig.2

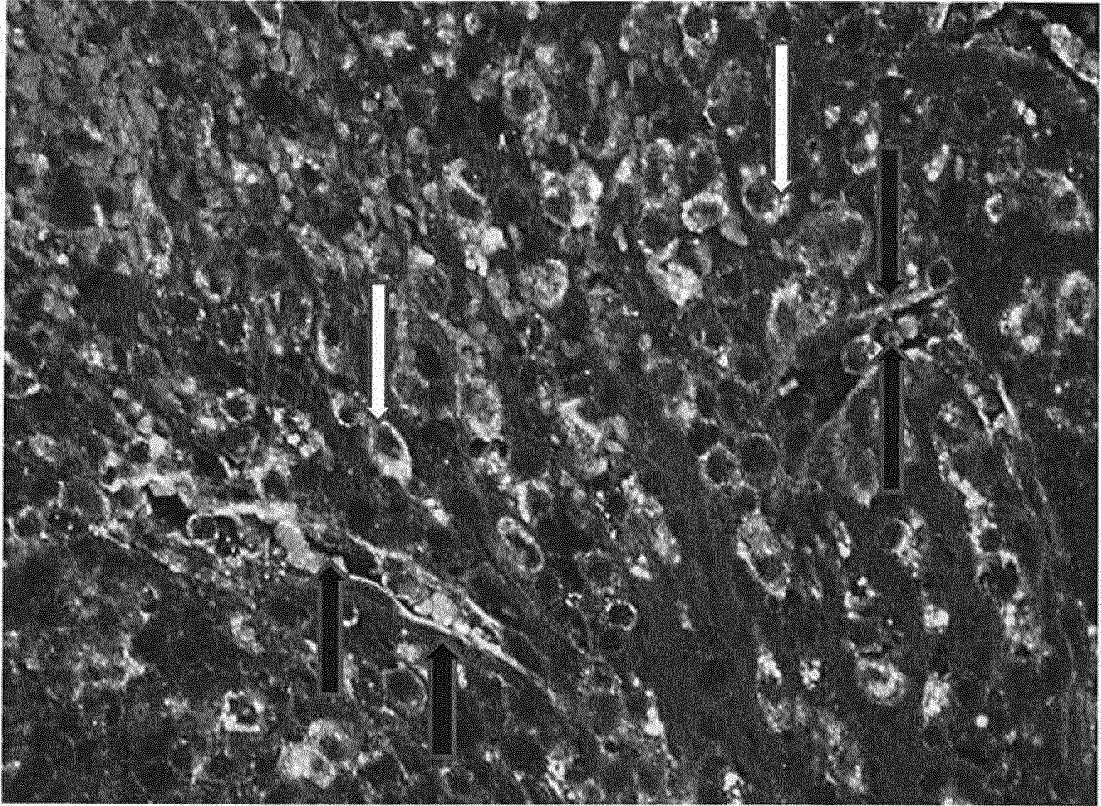


Fig. 3

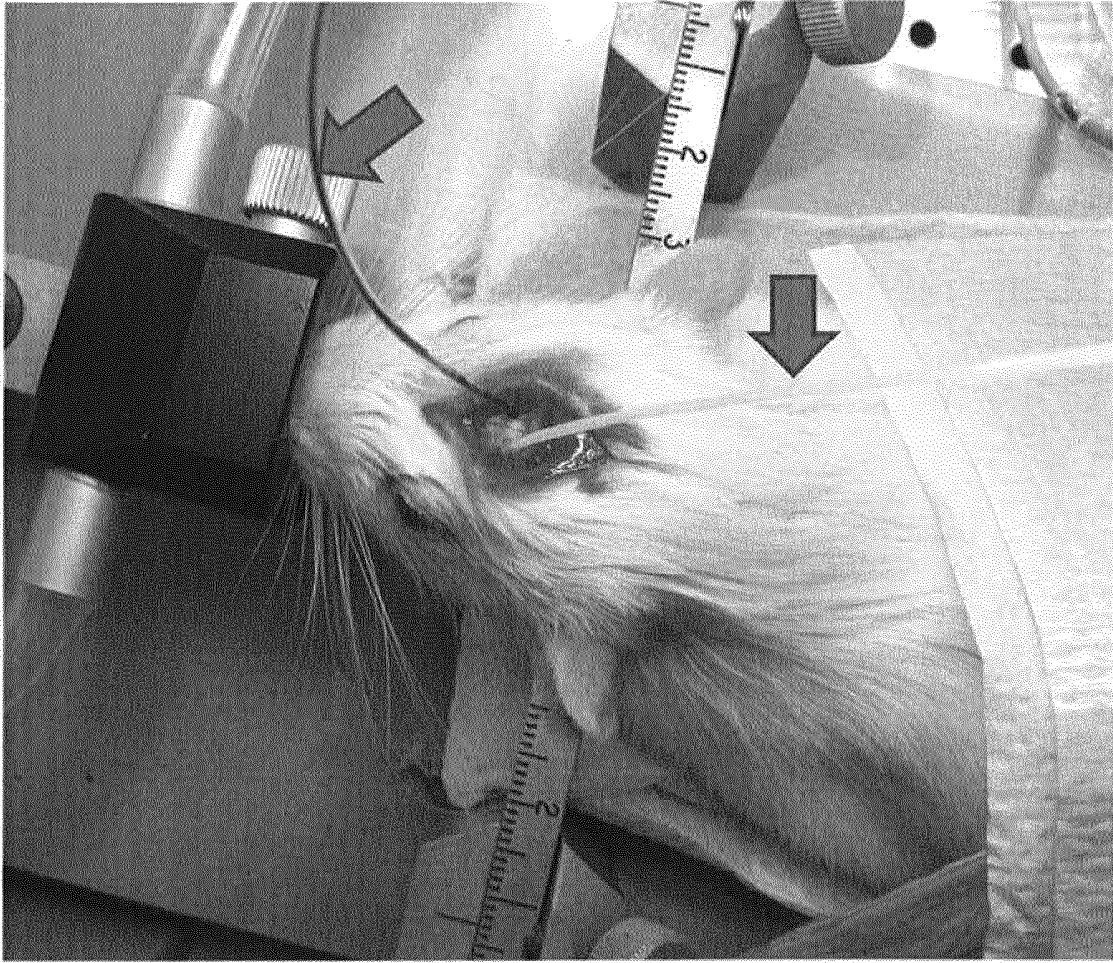


Fig. 4

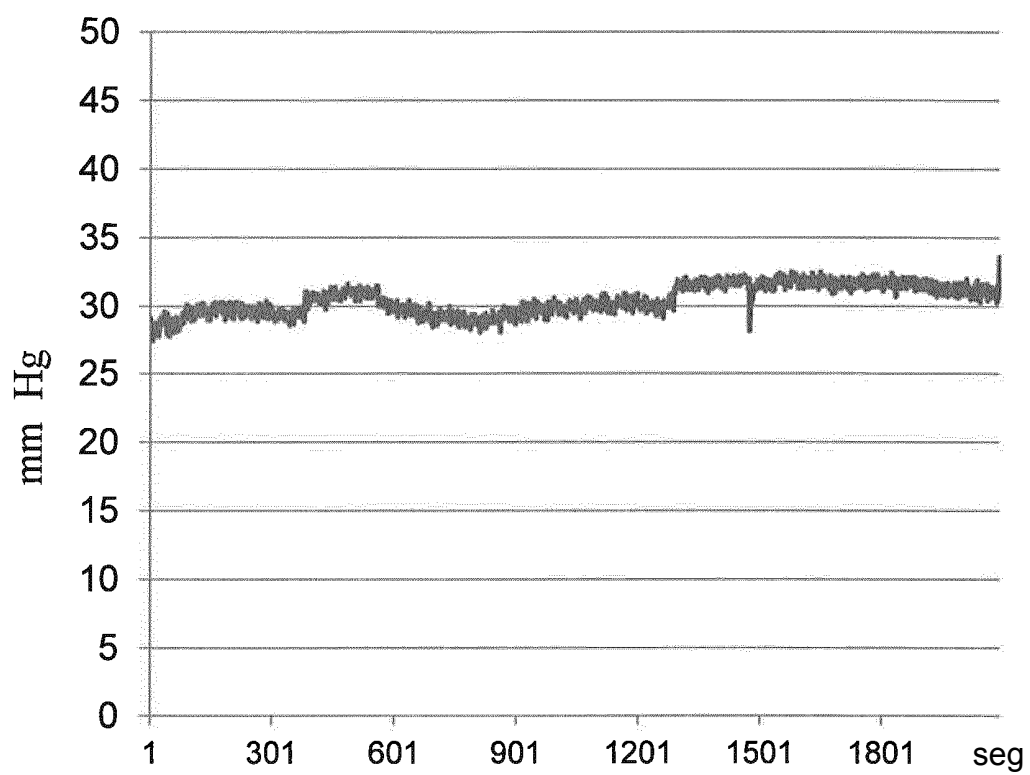


Fig.5

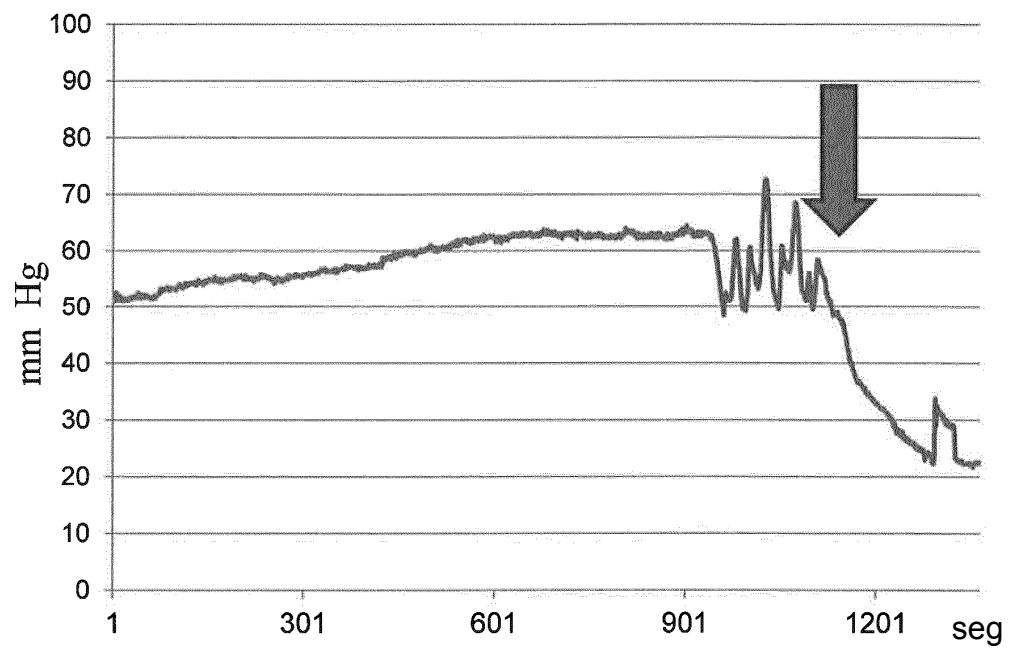


Fig.6

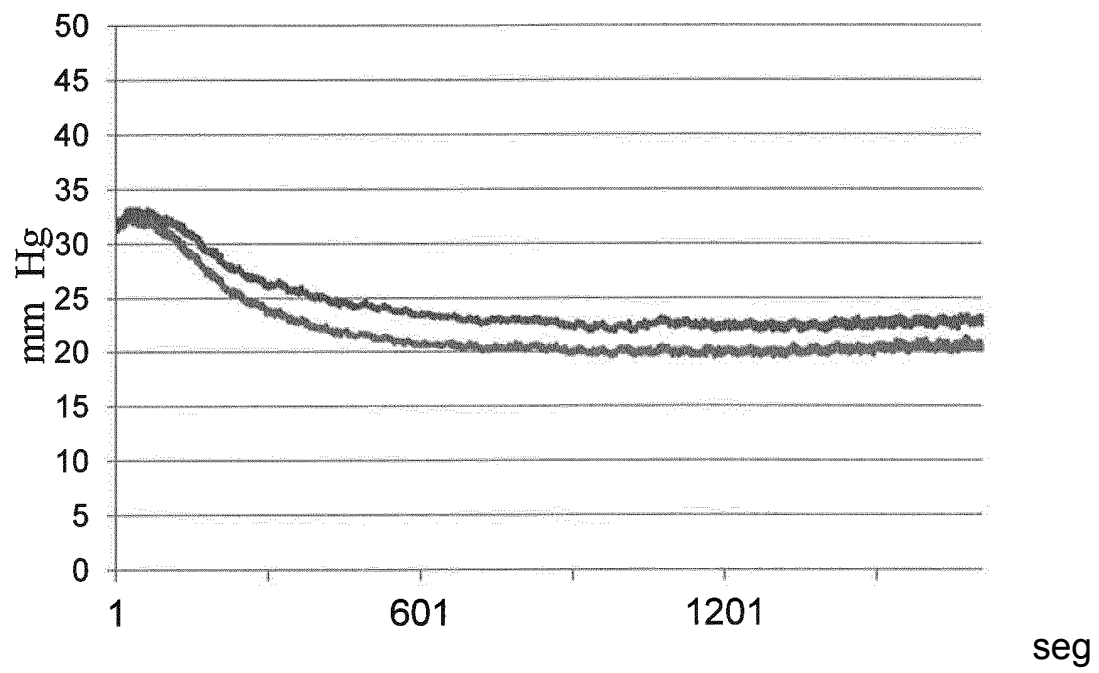


Fig.7

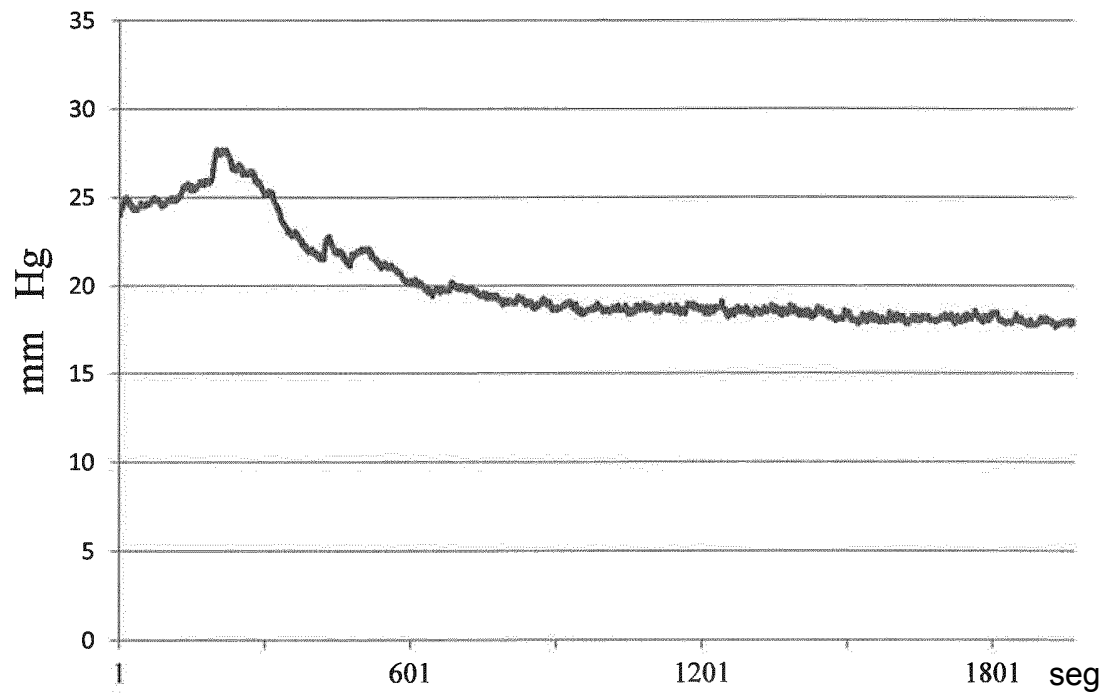


Fig.8

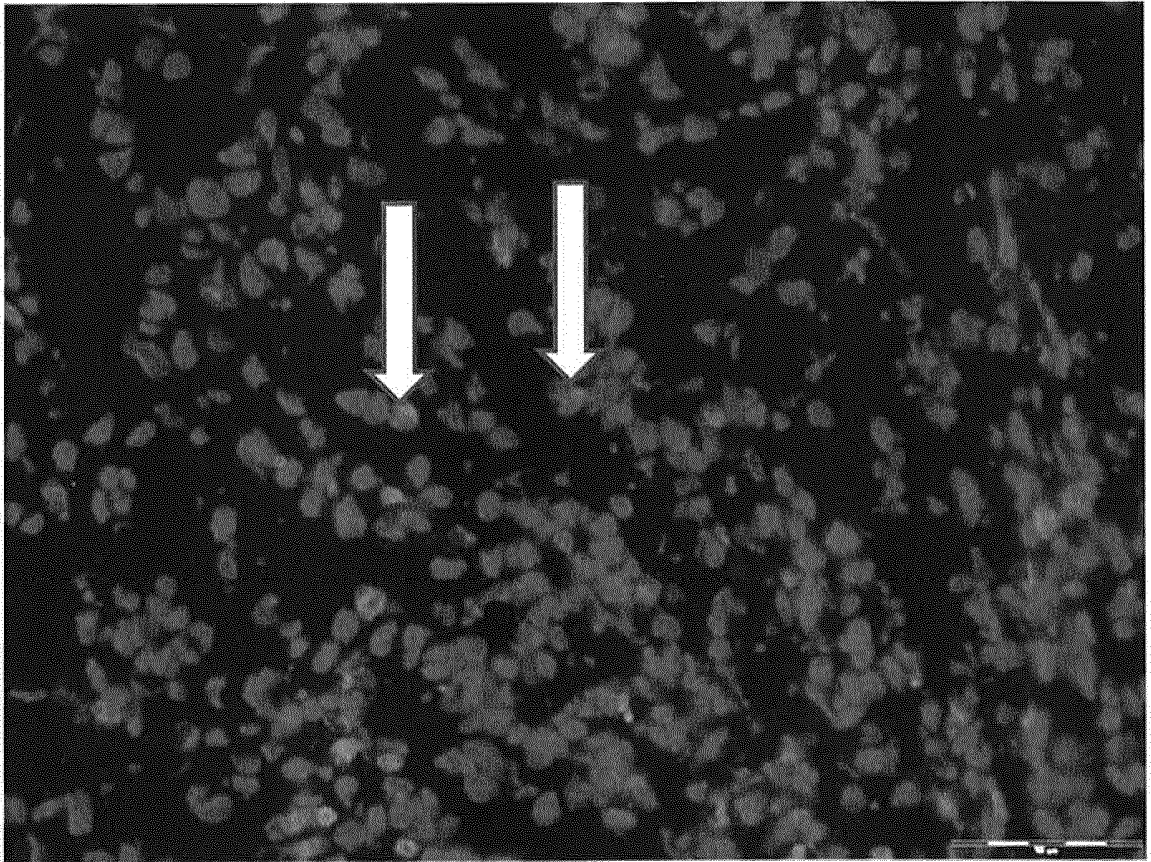


Fig.9

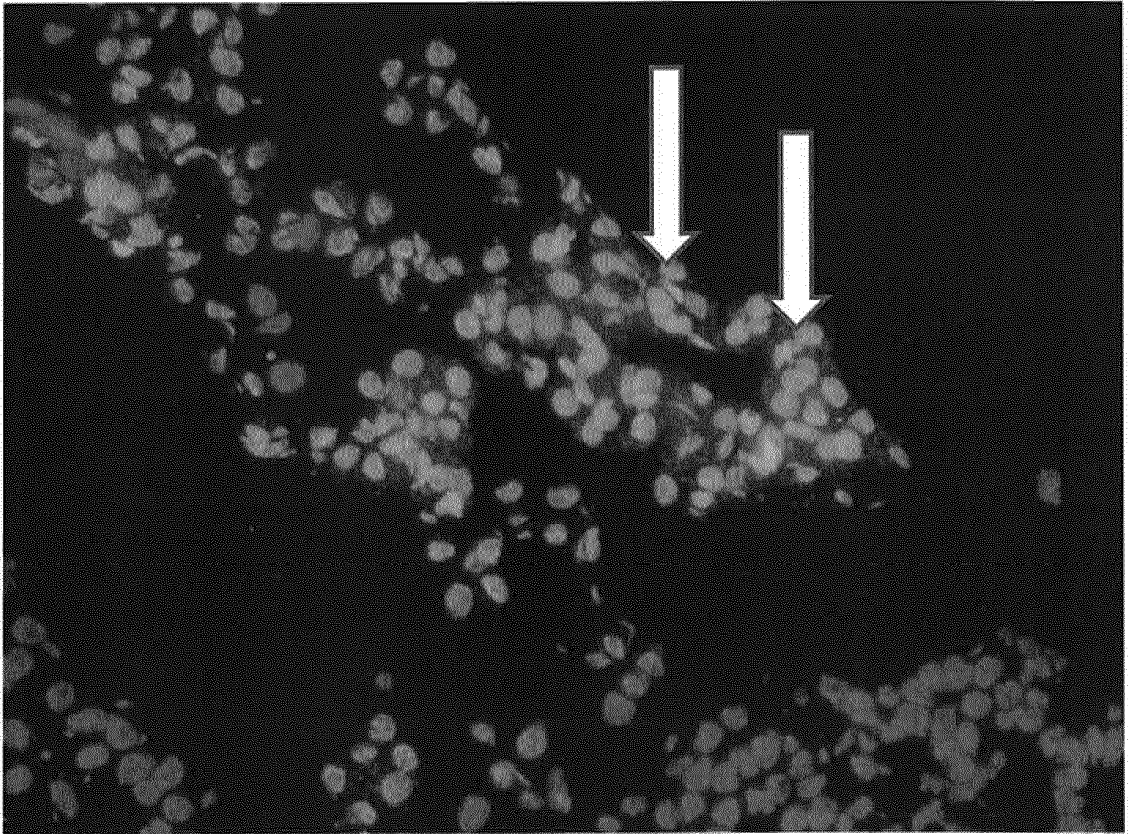


Fig.10