

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 572**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 7/64** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/FR2012/051593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12738574 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2729495**

54 Título: **Péptido antagonista de la unión entre el CD47 y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas**

30 Prioridad:

**08.07.2011 FR 1156237**

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

**13.09.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
(100.0%)  
Villa Douce 9 Boulevard de la Paix  
51100 Reims, FR**

72 Inventor/es:

**DEDIEU, STÉPHANE;  
FLOQUET, NICOLAS;  
MARTINY, LAURENT;  
SCHNEIDER, CHRISTOPHE;  
JEANNE, ALBIN;  
SICK, EMILIE y  
DAUCHEZ, MANUEL**

74 Agente/Representante:

**GÓMEZ CALVO, Marina**

ES 2 681 572 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

Péptido antagonista de la unión entre el CD47 y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere al campo de las interacciones moleculares entre dos proteínas.
- [0002]** La invención se refiere más en concreto a las interacciones entre una proteína extracelular perteneciente a la familia de las trombospondinas y un receptor, el CD47, situado en la superficie de la membrana celular.
- 10 **[0003]** La presente invención encontrará una aplicación potencial principalmente en el campo de las patologías tumorales, trombóticas y cardiovasculares.
- [0004]** La invención se refiere más en concreto a un péptido que posee la capacidad de unir específicamente el dominio de unión al receptor CD47 de una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas, de manera que se impida la unión entre los dos antagonistas.
- 15 **[0005]** Las trombospondinas (TSP), y en concreto la TSP-1 y TSP-2, son proteínas conocidas por tener la capacidad de unirse al receptor CD47, lo que conlleva una señal que da lugar a una respuesta celular por parte de la célula. Una interacción de este tipo parece desempeñar un papel importante principalmente en procesos celulares fundamentales, como la regulación de la muerte celular programada, también denominada apoptosis, o la inflamación.
- 20 **[0006]** Por ejemplo, trabajos recientemente realizados por los inventores han permitido poner de manifiesto el papel antiapoptótico de la TSP-1 en células cancerosas de carcinoma folicular de tiroides humano, también denominadas células FTC (Rath *et al.*, 2006). Otros estudios han demostrado asimismo que una disminución de la expresión de la TSP-1 conlleva la reversibilidad del fenotipo de los carcinomas escamosos gracias al uso de una estrategia antisentido.
- 25 **[0007]** Investigaciones adicionales, llevadas a cabo para tratar de poner de manifiesto el papel de la TSP-1 en el desarrollo de las células del cáncer de mama, han aportado resultados contradictorios; de hecho, determinadas investigaciones concluyen que la TSP-1 presenta un efecto proapoptótico, es decir, que inhibiría el crecimiento del tumor mamario (Esemuede *et al.*, 2004; Manna y Frazier 2004). Al contrario, otros estudios defienden el concepto inverso según el cual la TSP-1 desempeñaría un papel antiapoptótico y/o aumentaría las propiedades invasivas de dichas células tumorales (Wang *et al.*, 1996a, 1996b).
- 30 **[0008]** La comprensión de los mecanismos moleculares que dan lugar a la interacción entre las proteínas pertenecientes a la familia de las trombospondinas y sus receptores, así como el descubrimiento de las respuestas celulares resultantes, constituyen por tanto una etapa importante para establecer estrategias terapéuticas destinadas a inhibir el desarrollo y la proliferación de las células cancerosas.
- 35 **[0009]** Determinados documentos del estado de la técnica ya recomiendan utilizar las propiedades de interacción entre las trombospondinas y sus receptores, en concreto el CD47, a fin de desarrollar estrategias para o bien disminuir, o bien aumentar, la tasa de apoptosis de células que sean cancerosas o no.
- 40 **[0010]** Así, se conoce del estado de la técnica, por ejemplo del documento de patente US 7,582,725 B2 el uso de un agente que se une o al receptor CD47, o a la trombospondina-1 de forma que inhibe la unión entre dicha TSP-1 y dicho receptor CD47. El hecho de impedir esta interacción permitiría reducir significativamente la tasa de apoptosis de determinadas células, como los fibroblastos o las células epiteliales, implicadas principalmente en los procesos de cicatrización en los cuales desempeñan un papel importante. Preferiblemente, con el objetivo de disminuir la tasa de apoptosis inducida por la proteína TSP-1, se utiliza un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos de fórmula general R-A1-Y-V-V-M.
- 45 **[0011]** No obstante, en el caso de la presente invención, las células a localizar y el objetivo que se quiere lograr son completamente distintos. De hecho, en nuestro caso no se trata de intentar detener la apoptosis celular sino, al contrario, de favorecer la muerte de las células cancerosas (apoptosis y/o necrosis). Así, el péptido propuesto por el documento anteriormente mencionado no está adaptado para resolver el problema planteado, a saber, inhibir el potencial invasivo de las células cancerosas, en concreto favoreciendo la entrada en apoptosis de estas últimas.
- 50 **[0012]** Asimismo, se conoce en el estado de la técnica el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la proteína TSP o bien contra el receptor CD47. Ello tiene como consecuencia impedir la interacción entre estas dos proteínas y, por tanto, inhibir las respuestas celulares resultantes.
- 55
- 60

**[0013]** Así, se conoce el documento WO 97/27873 que describe anticuerpos monoclonales que unen específicamente el CD47. No obstante, el inconveniente principal de esta técnica es que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una u otra de las proteínas no se unirán específicamente en el nivel preciso del sitio de unión entre el TSP y el CD47. Así, el bloqueo de la interacción entre las dos proteínas puede no ser óptimo, y la fijación del anticuerpo, ya sea sobre la TSP o sobre el CD47, puede impedir la interacción de dichas proteínas con sus otros ligandos naturales. En consecuencia, otros procesos celulares, que son indispensables para el organismo y que aplican una u otra de las proteínas anteriormente mencionadas, pueden inhibirse o suprimirse de este modo. Asimismo, otro gran inconveniente de una estrategia de este tipo reside en el hecho de que el anticuerpo anti-CD47 puede actuar en determinados casos como un agonista del receptor, es decir, que puede activar este por medio de la interacción.

El documento de patente CA 244 6391 utiliza asimismo las propiedades de unión entre el receptor CD47 y su ligando, la proteína TSP-1. Más en concreto, se aprovecha el papel de estas dos moléculas en la reacción inmunitaria, y principalmente en la reacción inflamatoria. El documento da a conocer así el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CD47 con el fin de inhibir principalmente la actividad de los linfocitos T supresores. Una inhibición de este tipo desempeñaría un papel beneficioso en procesos celulares variados, en concreto en la neutralización de agentes infecciosos, reacciones alérgicas, enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias, etc.

**[0014]** No obstante, como se explica anteriormente, el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra una u otra de las dos proteínas no constituye una solución satisfactoria.

**[0015]** El documento WO 2010/017332 A2 también se refiere a la inhibición de la interacción entre el receptor CD47 y la trombospondina. En concreto, dicho documento presenta el uso de agentes muy diversos para inhibir dicha interacción previa al tratamiento por radioterapia de un paciente, de modo que se facilite la ablación del tumor. De hecho, impedir la interacción TSP-1/CD47 favorecería la protección de las células del sistema inmunitario contra los daños provocados por una exposición de estas a las radiaciones. Por tanto, la respuesta inmunitaria contra células tumorales aumentaría considerablemente.

**[0016]** No obstante, los agentes utilizados no están adaptados para bloquear específicamente el sitio de unión de la TSP al receptor CD47. La invención ofrece la posibilidad de paliar, al menos en parte, los diversos inconvenientes del estado de la técnica proponiendo un péptido antagonista de la interacción del CD47 con proteínas pertenecientes a la familia de las trombospondinas, en concreto las TSP-1 y 2. De forma particularmente ventajosa, el péptido se fija únicamente en el nivel del dominio de la TSP que interactúa con el receptor CD47, de forma que deja libres el resto de dominios de la TSP y la totalidad del dominio extracelular del CD47 para que puedan unirse a sus ligandos naturales. La naturaleza de la invención, es decir, el péptido antagonista, permitiría facilitar la liberación de la sustancia activa, y mejorar su biodisponibilidad en las células diana limitando al mismo tiempo el carácter inmunógeno. Otra ventaja reside en el hecho de que el péptido antagonista permite a la vez inhibir la unión del CD47 con la TSP-1 y con la TSP-2.

**[0017]** Con este objetivo, la presente invención se refiere a un péptido antagonista de la unión entre un receptor CD47, y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas, o TSP.

**[0018]** El péptido según la invención es particular en el sentido de que presenta la siguiente secuencia S1:

S1: R1-R2-R3-S-Q-L-L-K-G-R4-R5-R6

**[0019]** De forma particularmente ventajosa, dicho péptido interactúa específicamente con el extremo C-terminal de la TSP, en el nivel del sitio de unión entre dicha TSP y dicho receptor CD47, de forma que impide una interacción entre dicho receptor CD47 y dicha proteína.

**[0020]** Según un ejemplo de realización, los radicales R1, R3 y R5 corresponden cada uno a un aminoácido apolar seleccionado entre la isoleucina (I) y/o la leucina (L) y/o la valina (V) y/o la alanina (A).

**[0021]** Según otro ejemplo de realización interesante, los radicales R2 y R4 corresponden cada uno a un aminoácido polar cargado negativamente seleccionado entre el ácido glutámico (E) y/o el ácido aspártico (D).

**[0022]** De forma ventajosa, R6 corresponde a un aminoácido polar y no cargado que comporta un radical hidroxilo seleccionado entre la serina (S) o la treonina (T).

**[0023]** Evidentemente, dichas formas de realización no son limitadoras de la invención. De hecho, como se menciona más adelante, los radicales R1 a R6 pueden corresponder a la cisteína (C) de forma que permitan una ciclación del péptido.

**[0024]** De forma particularmente ventajosa, la secuencia S1 del péptido según la invención es igual a la siguiente secuencia identificada como secuencia S2:

S2: I-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-S

5 **[0025]** Según una forma de realización particularmente preferida, el péptido según la presente invención, cuya forma está representada más arriba, es ciclado.

**[0026]** Todavía más preferiblemente, la ciclación de dicho péptido se efectúa por medio de un puente disulfuro entre dos aminoácidos de tipo cisteína (C).

10 **[0027]** Así, de forma particularmente ventajosa, el péptido según la presente invención presenta la secuencia S1 igual a la siguiente secuencia, identificada como secuencia S3:

S3: C-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-C

**[0028]** Según una forma de realización ventajosa, el péptido según la invención se obtiene por vía recombinante.

15 **[0029]** De forma todavía más preferible, dicho péptido se obtiene por síntesis química.

**[0030]** La invención se refiere también al uso del péptido en el marco del tratamiento contra el cáncer.

20 **[0031]** Más en concreto, el péptido puede utilizarse principalmente en el marco del tratamiento contra el cáncer folicular de tiroides, el cáncer mamario o el melanoma.

**[0032]** No obstante, dicho listado no es exhaustivo y el péptido según la invención también podría resultar interesante para el tratamiento de otros tipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de páncreas o de colon.

25 **[0033]** La invención se refiere asimismo a un uso del péptido para impedir la interacción entre la trombospondina-1 y el receptor CD47 e inhibir el efecto antiapoptótico de dicha interacción en las células cancerosas.

30 **[0034]** La invención se refiere además a un uso del péptido para impedir la interacción entre la trombospondina-2 y el receptor CD47 e inhibir el efecto antiapoptótico de dicha interacción en las células cancerosas.

**[0035]** La presente invención se refiere además a un ácido nucleico aislado que codifica el péptido según la presente invención.

35 **[0036]** En la presente descripción, se utiliza el código internacional de aminoácidos de una letra. Así, A corresponde a alanina (Ala), C a cisteína (Cys), D a ácido aspártico (Asp), E a ácido glutámico (Glu), F a fenilamina (Phe), G a glicina (Gly), H a histidina (His), I a isoleucina (Ile), K a lisina (Lys), L a leucina (Leu), M a metionina (Met), N a asparagina (Asn), P a prolina (Pro), Q a glutamina (Gln), R a arginina (Arg), S a serina (Ser), T a treonina (Thr), V a valina (Val), W a triptofano (Trp) e Y a tirosina (Tyr).

40 **[0037]** La presente invención comporta numerosas ventajas. Por un lado, el péptido antagonista se fija únicamente en el nivel del dominio de la TSP que interactúa con el receptor CD47, de forma que deja libre el resto de dominios de la TSP y la totalidad del dominio extracelular del CD47 para que puedan unirse a sus ligandos naturales. Ello permite facilitar la liberación de la sustancia activa, el péptido antagonista en este caso, y mejorar su biodisponibilidad en las células diana limitando al mismo tiempo el carácter inmunógeno. Por otro lado, el péptido antagonista permite a la vez inhibir la unión del CD47 con la TSP-1 y con la TSP-2. De hecho, la mayoría de los trabajos se han llevado a cabo sobre la TSP-1, pero esta presenta una fuerte homología con la TSP-2.

**[0038]** Asimismo, este porcentaje de homología entre la TSP-1 y la TSP-2 es particularmente importante en su extremo carboxi terminal (C-terminal), más en concreto todavía en la secuencia implicada, lo que lleva a pensar que, por un lado, la TSP-2 actúa de forma similar a la TSP-1 frente al receptor CD47 y que, por otro lado, el péptido según la invención permitirá inhibir también la interacción entre la proteína TSP-2 y el receptor CD47.

50 **[0039]** Otras características y ventajas de la invención surgirán de la siguiente descripción detallada de las formas de realización no limitadoras de la invención, en referencia a las figuras anexas, en las cuales:

- 5           – La figura 1 ilustra la actividad caspasa-3, marcador de la apoptosis celular, obtenida midiendo la cantidad de para-nitroanilina liberada por hora y µg de proteína (en ordenadas). La actividad caspasa-3 se mide en células de carcinoma folicular de tiroides en presencia de una molécula anticancerosa que induce la apoptosis, la camptotecina (Cpt) o la doxorubicina (Dox) en presencia o ausencia de TSP-1.
- 10          – La figura 2 ilustra el papel del péptido 4N1 (K-R-F-Y-V-V-M-W-K), derivado del dominio C-terminal de la TSP-1, y del receptor CD47 en la regulación de la apoptosis inducida por la camptotecina (Cpt) o la doxorubicina (Dox). Para ello, las células de carcinoma de tiroides (FTC-133) se han incubado en presencia de 5 µM de cualquiera de los dos fármacos y 100 µM de péptido de ensayo 4N1 con o sin anticuerpo B6H12 (100µg/mL) que bloquea el receptor CD47. El mismo experimento se ha llevado a cabo con un péptido control 4NGG (K-R-F-Y-G-G-M-W-K), incapaz de unir el CD47.
- 15          – La figura 3 es una representación de la dinámica de apertura del dominio C-terminal de la proteína TSP-1 que deja manifestarse al péptido 4N1 (K-R-F-Y-V-V-M-W-K) cuyos aminoácidos se representan por medio de esferas de color más oscuro.
- 20          – La figura 4 ilustra un modelo de interacción molecular entre el dominio C-terminal de la TSP-1 (a la izquierda de la figura) y el dominio extracelular del receptor CD47 (unido a la membrana citoplásmica representada en gris claro). Este modelo se obtiene por medio de la técnica de acoplamiento proteína-proteína. La flecha visible entre las dos proteínas corresponde a la zona de interacción molecular.
- 25          – La figura 5 representa la inhibición de la interacción biomolecular entre la TSP-1 y el receptor CD47 de células MDA-MB-231 de cáncer mamario. Las células se incuban durante 2 h en ausencia (Ctrl) o en presencia (pept.) de 100µM del péptido antagonista según la invención. A continuación, los complejos TSP-1/CD47 se inmunoprecipitan utilizando un anticuerpo anti-CD47 y después se analiza la presencia de TSP-1 y de CD47 gracias a la técnica de la inmunoelectrotransferencia.
- 30          – La figura 6 ilustra la acción del péptido antagonista ciclado sobre células de melanoma murino. Tras una inyección subcutánea de 250 000 células B16F1 de melanoma murino a ratones singénicos C57B1/6, se efectúan administraciones intraperitoneales de 10mg/kg del péptido antagonista en los días 3, 5 y 7. A continuación, se sacrifican los ratones y los tumores se fotografían en el día 20.
- 35          – La figura 7 corresponde a un análisis IRM de un tumor sin tratar (a la izquierda) y de un tumor tratado con el péptido de interés ciclado en el día 12. Una flecha apunta a la zona necrótica.
- 40          – La figura 8 corresponde a una fotografía de células observadas con microscopio de contraste de fase con un aumento de 100X. Células HUVEC («human umbilical vein endothelial cells») se tratan previamente en primer lugar con una molécula antimitótica, la mitomicina (10µg/mL), durante 2 h a 37 °C y después se realiza una herida en el tapiz celular confluyente. A continuación, las células se incuban durante 9 h a 37 °C con el péptido descrito según la invención. La fotografía de la izquierda corresponde a células «control» mientras que la de la derecha representa células tratadas con el péptido de interés (100uM).

45           **[0040]** Las proteínas pertenecientes a la familia de las trombospondinas, y en concreto las trombospondinas-1 y -2, respectivamente TSP-1 y TSP-2, son macromoléculas de la matriz extracelular. Intervienen en la modulación de numerosas interacciones entre la matriz y la célula y entre las células entre sí.

50           **[0041]** Más en concreto, las trombospondinas son glicoproteínas que presentan una estructura en multidominios, estando implicado cada dominio en diversas funciones debido a su capacidad para unir una diversidad de receptores celulares de superficie.

55           **[0042]** La familia de las trombospondinas cuenta con cinco proteínas, TSP-1 a TSP-5, y se divide en dos subgrupos. Las TSP-1 y TSP-2 pertenecen al primero de dichos grupos, debido a su estructura común en homotrímero consistente en tres subunidades idénticas. Estos tres monómeros, cada uno de los cuales presenta un peso molecular aproximado de 150 000 Da, se enlazan entre sí por medio de puentes disulfuro. Los monómeros de TSP-1 y de TSP-2 presentan una tasa de homología que va aumentando del extremo N-terminal (32 % de homología) hacia el extremo C-terminal (82 % de homología). Asimismo, la mayor parte de las secuencias de adhesión de la TSP-1 se conservan en la TSP-2. Por este hecho, y como se ha recordado anteriormente, es muy probable que la TSP-2 presente funciones similares a la TSP-1.

60           **[0043]** En cuanto a las TSP-3 a 5, son homopentámeros. Por tanto, sus estructuras y secuencias son diferentes de las de TSP-1 y 2.

**[0044]** Como hemos visto anteriormente, las trombospondinas son proteínas que se encuentran en la matriz extracelular. Así, estas proteínas, y en concreto la TSP-1, influyen en la estructura y composición de la matriz extracelular así como en el fenotipo celular debido a las interacciones que pueden establecer.

5 **[0045]** *In vitro*, las células de la pared vascular puestas en cultivo, las células endoteliales, las células musculares lisas y los fibroblastos, sintetizan y secretan la TSP-1 que incorporan también en la matriz extracelular. *In vivo*, la TSP-1 se detecta desde los primeros estadios de la embriogénesis y después durante el desarrollo embrionario en las regiones de migración celular. En adultos, se encuentra principalmente expresada en importantes concentraciones en los tejidos dañados o inflamados al comienzo de la reparación tisular.  
10 Asimismo, la TSP-1 puede ser sintetizada y secretada por células implicadas en la respuesta inmunitaria, tales como las plaquetas, los monocitos, los macrófagos alveolares, etc.

**[0046]** Las trombospondinas, y en concreto la TSP-1, están implicadas en diversos procesos celulares fundamentales. Así, la TSP-1 influye en numerosas funciones celulares, como la activación de las plaquetas, la angiogénesis, la cicatrización, la muerte celular programada y la progresión tumoral (Sid *et al.*, 2004). La TSP-2 presenta una estructura en dominios próxima a la de la TSP-1 y, por tanto, determinadas funciones ejercidas por la TSP-2 son similares a las de la TSP-1. En concreto, estas dos proteínas inhiben la angiogénesis (Mirochnik *et al.*, 2008) que es un proceso que permite el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.  
15

**[0047]** Más en concreto, trabajos de investigación llevados a cabo por los inventores han permitido poner de manifiesto el papel antiapoptótico de la TSP-1 en las células cancerosas de carcinoma de tiroides humano (Rath *et al.*, 2006). A este respecto, los inventores han probado que la TSP-1 desempeña un papel importante en la resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos, en concreto a la doxorrubicina y la camptotecina. Estos dos últimos ejercen un efecto citotóxico induciendo la apoptosis en numerosos tipos celulares.  
20

**[0048]** En referencia a la figura 1, cabe observar que la actividad caspasa-3, considerada como un buen marcador de las células que entran en apoptosis, está considerablemente inhibida en presencia de TSP-1 con respecto a la misma actividad en presencia de doxorrubicina o de camptotecina pero en ausencia de TSP-1. Esta última disminuye, pues, la tasa de apoptosis de las células de carcinoma de tiroides sometidas a un tratamiento anticanceroso.  
25

**[0049]** Los autores han demostrado asimismo que el nivel de expresión de la TSP-1 está correlacionado con el potencial invasivo de las células de carcinoma de tiroides utilizando dos líneas de células cancerosas (FTC-138 y FTC-133) que tienen una capacidad de invasión diferente (Sid *et al.*, 2008).  
30

**[0050]** Posteriormente, el uso del péptido 4N1, que presenta la secuencia K-R-F-Y-V-V-M-W-K, ha permitido identificar el extremo C-terminal de la TSP-1 como responsable del efecto antiapoptótico. De hecho, este péptido es capaz de establecer una interacción molecular con el receptor CD47, lo que conllevará una respuesta por parte de la célula.  
35

**[0051]** El CD47, también denominado IAP por «integrin-associated protein», es un receptor celular transmembrana, perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas, que se expresa en una gran mayoría de células. El dominio extracelular del CD47 desempeña un papel central en la respuesta de las células y tejidos humanos tras la unión de la parte C-terminal de la TSP-1 o de la TSP-2.  
40

**[0052]** Por tanto, los inventores han tratado de comprender el papel del péptido 4N1 y del receptor CD47 en la inhibición de la apoptosis de las células cancerosas, y en concreto de las células FTC-133 de carcinoma de tiroides humano (Rath *et al.*, 2006).  
45

figura 2

**[0053]** Como puede verse en la , en presencia de péptido 4N1 exógeno, la viabilidad de las células tumorales es más importante con respecto a la de las células únicamente tratadas con cualquiera de los dos fármacos, camptotecina y doxorrubicina, o con el péptido control 4NGG.  
50

**[0054]** El péptido 4N1, derivado del extremo C-terminal de la TSP-1, presenta por tanto propiedades antiapoptóticas que conllevan una resistencia de las células de carcinoma de tiroides a las moléculas anticancerosas de tipo camptotecina y doxorrubicina. Al contrario, el péptido control 4NGG no presenta ningún efecto en la disminución del número de células tumorales inducida por los dos medicamentos anteriormente citados.  
55

**[0055]** Asimismo, en presencia del péptido de interés 4N1 y cuando se añade el anticuerpo B6H12 que bloquea el CD47, dicho péptido ya no permite la protección de las células tumorales contra los anticancerosos utilizados.  
60

[0056] Los diferentes resultados obtenidos permiten, pues, probar que la trombospondina, y en concreto la TSP-1, interactúa con las células tumorales uniéndose por medio de su extremo C-terminal a un receptor, el CD47. El receptor CD47 representa, pues, una proteína de membrana de «relé» en el control negativo de la apoptosis de las células tumorales por el péptido 4N1 localizado en el extremo C-terminal de la TSP-1.

[0057] Estos resultados muestran también que numerosas secuencias peptídicas propuestas en el estado de la técnica, idénticas o muy próximas a la del péptido 4N1, no están claramente adaptadas para un uso en el presente caso. De hecho, dicho péptido presenta efectivamente la capacidad de fijarse en el receptor CD47 y, por tanto, conlleva una inhibición de la unión entre este último y una proteína de tipo TSP-1 o TSP-2. No obstante, los resultados anteriormente mencionados demuestran que una unión de este tipo entre el péptido 4N1 y el receptor CD47 aumenta la viabilidad de las células tumorales y su resistencia contra determinados medicamentos. Por tanto, el péptido 4N1 actúa como un agonista del receptor CD47.

[0058] Es por ello que en el marco de un enfoque original e inventivo los inventores han tratado de profundizar en el conocimiento relativo a las interacciones moleculares, entre el receptor CD47 y la TSP-1, responsables de los efectos biológicos anteriormente citados, y en concreto el efecto antiapoptótico en las células tumorales.

[0059] Por tanto, se ha iniciado la modelización molecular del extremo C-terminal de la TSP-1 y, más en concreto, la modelización de la interacción entre la región que contiene la secuencia 4N1 y el receptor CD47.

[0060] A continuación, se ha utilizado la técnica de análisis de los modos normales para identificar los movimientos de la parte C-terminal de la TSP-1 (*Floquet et al.*, 2008). Se ha elegido esta técnica puesto que las meras simulaciones de dinámica molecular clásicas y los métodos biofísicos experimentales no permiten obtener resultados satisfactorios. Asimismo, la interacción entre el receptor CD47 y la TSP-1 no puede explicarse únicamente gracias a la estructura cristalográfica de la TSP-1 disponible en el Protein Data Bank (PDB). De hecho, la estructura disponible de la TSP-1, obtenida por difracción por rayos X, permite únicamente describir la secuencia 4N1 como completamente oculta en un bolsillo hidrofóbico de la proteína TSP-1, haciendo de este modo imposible toda interacción de dicha secuencia con un ligando.

[0061] Los resultados obtenidos por *Floquet et al.* (2008), ilustrados en la figura 3, permiten explicar el mecanismo que da lugar a la interacción entre el péptido 4N1 y el receptor CD47. De hecho, los análisis han permitido principalmente identificar que el bolsillo hidrofóbico, en el nivel de la proteína TSP-1, se abre cuando se aproxima al receptor CD47 por medio de un «scratch» electrostático. Por tanto, esta abertura permite revelar y dar acceso a la secuencia biológicamente activa del péptido 4N1; la interacción entre la TSP-1, por medio de dicho péptido, y el CD47 puede efectuarse entonces.

[0062] El movimiento de abertura del bolsillo hidrofóbico se ha explorado, pues, en detalle y ello ha permitido generar diferentes estructuras más o menos abiertas de la proteína TSP-1.

[0063] Paralelamente, se han generado varios modelos de la parte extracelular del receptor CD47 por medio de la técnica de modelización por homología.

[0064] Asimismo, análisis adicionales, efectuados gracias al método de acoplamiento proteína-proteína, han permitido predecir la región de interacción potencial entre la estructura abierta de la TSP-1 y el receptor CD47. Los resultados obtenidos son visibles en la figura 4.

[0065] Los modelos de interacción obtenidos han permitido entonces proponer fragmentos peptídicos que imitan las secuencias del receptor CD47 implicadas en la interacción con la proteína TSP-1.

[0066] Por tanto, los péptidos propuestos permiten ventajosamente fijarse en el extremo C-terminal de la TSP-1, y en concreto en la región de interacción constituida por el péptido 4N1, cuando este es accesible, principalmente en el caso de la proximidad del receptor de membrana CD47. Dicho de otro modo, los péptidos según la invención permiten antagonizar la interacción TSP-1/CD47 fijándose muy específicamente en la TSP-1 en el sitio de unión entre dichas dos proteínas.

[0067] De este modo, el receptor celular CD47 se queda libre y puede interactuar libremente con sus ligandos habituales, además de la TSP-1. Asimismo, el resto de dominios de la proteína TSP-1 conservan también su capacidad de unión. Por tanto, el péptido según la presente invención es particularmente ventajoso cuando se conoce la importancia de las dos proteínas TSP-1 y CD47 en numerosos procesos celulares fundamentales.

[0068] Según una forma de realización particularmente interesante, el péptido seleccionado para antagonizar la unión entre la proteína TSP-1 y el receptor CD47 corresponde a una secuencia corta del dominio extracelular de dicho receptor, y más concretamente en un dodecapéptido que presenta la siguiente secuencia S1:

S1: R1-R2-R3-S-Q-L-L-K-G-R4-R5-R6

[0069] Preferiblemente, R1 corresponde a un aminoácido perteneciente al grupo de los aminoácidos apolares, es decir, la isoleucina (I) o la leucina (L) o la valina (V) o la alanina (A). Lo mismo se aplica para R3 y R5.

[0070] Según una forma de realización interesante, el aminoácido R2 pertenece al grupo de los aminoácidos polares y cargados negativamente, es decir, el ácido glutámico (E) o el ácido aspártico (D). Lo mismo se aplica para R4.

[0071] De manera ventajosa, el aminoácido R6 pertenece al grupo de los aminoácidos polares y no cargados que presentan un radical hidroxilo (-OH). Así, R6 corresponde a la serina (S) o a la treonina (T).

[0072] El hexapéptido central, de fórmula S-Q-L-L-K-G, resulta particularmente ventajoso para permitir la unión del péptido según la invención en el dominio C-terminal de la TSP-1. Los aminoácidos que le preceden o le siguen en la secuencia S1 pueden modificarse pero es preferible conservar dicho hexapéptido para una unión óptima con la proteína TSP-1.

[0073] Según una forma de realización particularmente ventajosa, el dodecapéptido según la presente invención presenta una secuencia S1 que corresponde a la siguiente secuencia identificada como S2:

S2: I-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-S

[0074] De hecho, dicha secuencia S2 particular resulta óptima para antagonizar la interacción de la proteína TSP-1 con el receptor CD47.

[0075] Ya se sabe, por los resultados de las investigaciones anteriores llevadas a cabo por los inventores, que el hecho de bloquear la unión TSP-1/CD47 conlleva un aumento de la inhibición de la apoptosis de las células cancerosas de carcinoma de tiroides humano (Rath *et al.*, 2006). Por lo tanto, el uso del péptido según la invención permite, en concreto pero no de forma limitadora, una inhibición de la invasión de los tejidos por parte de las células tumorales de carcinoma de tiroides.

[0076] Por ello, se han llevado cabo trabajos para confirmar dichos resultados utilizando células tumorales procedentes de otros tipos de cáncer.

[0077] Así, células MDA-MB-231, correspondientes a células procedentes de un cáncer mamario, se han incubado durante 24 h, con o sin el dodecapéptido según la presente invención. En concreto, el péptido que se ha utilizado es el que presenta la secuencia S2: I-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-S.

[0078] A continuación, se han efectuado una inmunoprecipitación de los complejos, con un anticuerpo dirigido contra el CD47, y después un análisis de las proteínas TSP-1 y CD47 por inmunoelectrotransferencia. Los resultados se ilustran en la figura 5. Como se puede ver, la TSP-1 ya no se detecta por medio del análisis de inmunoelectrotransferencia tras la inmunoprecipitación cuando las células cancerosas se han incubado en presencia del péptido antagonista según la invención. Esto significa que el tratamiento realizado con dicho péptido permite suprimir la interacción molecular entre la proteína TSP-1 y el receptor CD47.

[0079] La invención se refiere también a un polipéptido que comporta un número inferior a 50 aminoácidos y que incorpora un péptido que presenta un porcentaje de homología de al menos un 60 % con la secuencia S2 según la invención, preferiblemente un 80 % de homología y todavía más preferiblemente un 95 % de homología, comprendiendo dicho péptido un hexapéptido central de secuencia S-G-L-L-K-G.

[0080] De hecho, una proporción de 7 aminoácidos de un total de 12, lo que corresponde a un porcentaje de homología de un 60 %, constituye una secuencia mínima activa suficiente para inhibir la unión entre la TSP-1 y el receptor CD47.

[0081] El uso de análogos estructurales no peptídicos de la secuencia según la invención también se contempla para inhibir la unión TSP-1/CD47.

[0082] Según un ejemplo de realización particularmente interesante, el péptido según la invención es ciclado. De hecho, parece ser que el segmento de CD47 correspondiente al péptido de la presente invención forma un bucle en el receptor. Así, una ciclación de este tipo es ventajosa puesto que permite estabilizar la interacción entre dicho péptido y el extremo C-terminal de la proteína TSP-1, lo que tiene como efecto mejorar la actividad biológica y la eficacia del péptido. Por otro lado, cálculos de dinámica molecular en diferentes péptidos derivados han demostrado que era posible estabilizar la estructura local realizando una ciclación de dichos péptidos.

**[0083]** La ciclación del péptido antagonista según la invención puede efectuarse por cualquier medio apto para este fin y conocido por el experto en la materia. En concreto, resulta ventajoso proceder a la ciclación por medio de una unión amídica.

5 **[0084]** Todavía más preferiblemente, la ciclación del péptido de interés se realiza por medio de un puente disulfuro, que es un enlace covalente fuerte que reúne las funciones tiol (-SH) de dos aminoácidos de tipo cisteína (C).

10 **[0085]** La elección del puente disulfuro para obtener un ciclopéptido es particularmente ventajosa puesto que permite conservar dicho péptido en forma de ion mixto a un pH fisiológico. Una molécula que presenta una forma de ion mixto comprende una carga positiva en el grupo amino y una carga negativa en el grupo carboxilo. La forma de ion mixto resulta ventajosa puesto que permite a la molécula conservar una buena solubilidad en un disolvente acuoso.

15 **[0086]** Así, según un ejemplo de realización particularmente preferido de la invención, el dodecapéptido presenta una secuencia S1 que corresponde a la secuencia identificada como S3: C-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-C. Los radicales R1 y R6 presentes en los dos extremos se han reemplazado cada uno por una cisteína. Los dos aminoácidos cisteína (C) en los extremos del péptido permitirán la formación de un puente disulfuro (-S-S-) entre sus respectivas funciones tiol.

20 **[0087]** El péptido que presenta la secuencia S3 anteriormente mencionada presenta los mismos resultados que el péptido no ciclado de secuencia S2 en lo que respecta al experimento de inmunoprecipitación de los complejos TSP-1/CD47 realizado en presencia de anticuerpos anti-CD47. En conclusión, el ciclopéptido permite también suprimir la interacción molecular entre la proteína TSP-1 y el receptor CD47.

25 **[0088]** La acción del dodecapéptido ciclado de secuencia S3 C-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-C ha sido probada también directamente *in vivo* en un modelo de melanoma murino B16F1 inyectado en ratones singénicos C57B1/6. Los resultados se representan en las figuras 6 y 7.

30 **[0089]** La figura 6 ilustra el aspecto de los tumores en el día 20 tras la inyección de las células de melanoma a los ratones C57B1/6 y tras el eventual tratamiento del animal con el péptido de interés ciclado. La mitad de los ratones (4/8) que han sido tratados con dicho péptido (a la derecha en la figura) muestran una fuerte zona necrótica localizada en el tumor mientras que ninguno de los ratones de «control» presenta tal necrosis.

35 **[0090]** La figura 7 permite comparar, por medio de un análisis de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), el tumor extraído en el animal no tratado con el tumor extraído en el animal tratado por el péptido ciclado por medio de un puente disulfuro en el día 12 tras la inyección de las células tumorales.

40 **[0091]** Cabe destacar en esta figura que el tumor procedente del animal tratado con el péptido ciclado según la invención presenta una zona necrótica que se pone de manifiesto con una flecha. Al contrario, el mismo tumor procedente de un animal no tratado no presenta ninguna zona necrótica. Por tanto, dicho péptido presenta una actividad antitumoral.

45 **[0092]** El péptido según la presente invención, y principalmente el péptido ciclado, puede utilizarse, pues, en el tratamiento del cáncer folicular de tiroides, del cáncer mamario o del melanoma. No obstante, dichos usos no son limitadores y se puede imaginar fácilmente que el péptido se la presente invención se utilice para el tratamiento de numerosos cánceres distintos de los citados anteriormente.

50 **[0093]** Otra ventaja de la invención, ilustrada en la figura 8, es que el péptido de interés permite inhibir la angiogénesis tumoral.

55 **[0094]** La angiogénesis es un proceso fisiológico normal, que interviene por ejemplo durante el crecimiento embrionario. No obstante, la angiogénesis puede corresponder también a un proceso patológico primordial en el crecimiento de los tumores cancerosos malignos y en la proliferación de las metástasis. De hecho, las células malignas necesitan oxígeno y nutrientes para su crecimiento. Por ello, las células inducirán la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes en tejidos sanos adyacentes. Cuando se forman estos nuevos vasos, permiten por un lado facilitar el crecimiento del tumor así como la diseminación de las células cancerosas hacia órganos distantes.

60 **[0095]** La angiogénesis es un proceso que se desarrolla en tres fases:

- el *sprouting* (gemación) que corresponde en un primer momento a una activación de las células que conlleva una degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular circundante y después a una migración de las células endoteliales. Las células proliferan y se diferencian en una estructura de tipo capilar para formar un vaso sanguíneo.

65

- la *intususpección*, durante la cual se realizará un ensanchamiento y una separación de los vasos sanguíneos ya formados.
- la septación, durante la cual las células endoteliales crecen en el interior de los vasos, creando canales vasculares separados.

5

**[0096]** Las trombospondinas, y en concreto la TSP-1, se conocen por desempeñar un papel en la modulación de la angiogénesis, principalmente en el contexto tumoral.

10

**[0097]** La interacción entre el receptor CD47 y la TSP-1 en concreto se conoce por presentar un efecto antiangiogénico. Por tanto, el uso en el contexto tumoral del péptido según la invención podía parecer arriesgado *a priori* debido a la supresión de dicho efecto antiangiogénico y al riesgo de una posible vascularización del tumor. No obstante, los estudios llevados a cabo por los inventores demuestran que, al contrario de lo que podía esperarse y de forma muy sorprendente, el péptido según la invención presenta en efecto antiangiogénico en las células sometidas a ensayo.

15

20

**[0098]** De hecho, la TSP-1, además de su interacción con el receptor CD47, también puede unirse al receptor CD36. Una interacción TSP-1/CD36 de ese tipo tendría por tanto una acción antiangiogénica sobre las células tumorales y/o endoteliales. Gracias al péptido según la presente invención, y como hemos visto anteriormente, se suprime la interacción TSP-1/CD47. No obstante, la unión entre la TSP-1 y el receptor CD36 siempre puede tener lugar debido a la extrema especificidad del péptido de interés que no impide que la TSP-1 se una con otros ligandos. Asimismo, dado que la TSP-1 ya no se une al receptor CD47, una proporción más importante de TSP-1 podrá fijarse al CD36, lo que conllevará una inhibición más importante de la angiogénesis tumoral.

25

**[0099]** La fotografía de la figura 8 ilustra la migración de células HUVEC, en presencia y en ausencia de péptido antagonista, después de que dichas células hayan estado sometidas a una herida cuyos contornos se representan en líneas de puntos. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes y muestran claramente que la primera fase del proceso de angiogénesis, a saber, la migración de las células, se inhibe en presencia del péptido antagonista según la invención.

30

**[0100]** Así, debido a la extrema especificidad del péptido antagonista según la invención, la proteína TSP-1 puede siempre unirse al receptor CD36. No obstante, también son posibles otras interacciones entre la TSP-1 y/o el CD47 y proteínas de membrana o incluso solubles. En concreto, interacciones con proteínas de membrana de tipo integrina, HSPG (heparin sulfate proteoglycan), SIRP (signal regulatory protein), etc. podrían participar eventualmente e incluso reforzar el efecto antitumoral y/o el efecto antiangiogénico del péptido antagonista.

35

**[0101]** En lo que respecta a la síntesis del péptido de interés según la presente invención, esta puede efectuarse, en concreto pero no de forma limitadora, por vía recombinante. Con este fin, una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente de ADN, que codifica dicho péptido puede introducirse en una célula huésped, preferiblemente por medio de un vector.

40

**[0102]** Así, la presente invención se refiere también a un ácido nucleico aislado que codifica el péptido según la invención. Preferiblemente, se trata de ADN pero también puede tratarse de ARN.

45

**[0103]** Todavía más preferiblemente, dicho péptido puede ser adquirido por medio de una técnica de síntesis química peptídica clásica conocida por el experto en la materia.

**[0104]** El péptido según la presente invención comporta, pues, numerosas y variadas ventajas. Por ejemplo, su secuencia corta es fácil de obtener, principalmente por medio de las técnicas clásicas de síntesis química.

50

**[0105]** No obstante, la ventaja más considerable reside en el hecho de que el péptido bloquea específicamente la unión TSP-1/CD47. Más en concreto, se bloquea el extremo C-terminal de la TSP-1. Así, el resto de dominios de la proteína TSP-1 pueden seguir interactuando con sus respectivos ligandos. En concreto, el dominio de la TSP-1 que comprende el dominio de repetición de tipo I (dominio de homología a la properdina) puede interactuar con el receptor celular CD36, lo que conlleva una inhibición de la angiogénesis. Así, se obtiene una disminución de la vascularización del tumor y, por tanto, una inhibición de la invasión por parte de las células cancerosas. El receptor CD47 también se queda libre y puede entonces unirse a sus ligandos naturales. Asimismo, no existe riesgo alguno de que el péptido según la invención sea un agonista del receptor CD47, como lo pueden ser moléculas ya usadas en el estado de la técnica para bloquear la interacción TSP-1/CD47, como los anticuerpos anti-CD47 o el péptido 4N1.

60

**[0106]** Así, el péptido antagonista presenta numerosas aplicaciones potenciales en patologías variadas, principalmente en patología tumoral, y en concreto en el carcinoma folicular de tiroides, el cáncer mamario o el melanoma, donde debería permitir limitar el desarrollo tumoral y/o metastásico de las células cancerosas. Por ejemplo, dicho péptido permitiría potenciar los efectos de los tratamientos quimioterapéuticos que inducen la

apoptosis en determinados tipos de células cancerosas; de hecho, el péptido de interés contribuiría a disminuir la resistencia de las células cancerosas a dichos tratamientos.

**[0107]** Por último, dado que numerosas referencias bibliográficas atribuyen a la proteína TSP un fuerte potencial vasoconstrictor y que el péptido según la invención es susceptible de tener un impacto sobre el desarrollo de estrategias proangiogénicas, pueden por tanto contemplarse aplicaciones potenciales en el campo de las patologías cardiovasculares y cerebrales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**[0108]**

- N. Esemuede, T. Lee, D. Pierre-Paul, B. Sumpio, V. Gahtan, The role of thrombospondin-1 in human disease. J. Surg. Res. 122 (2004) 135-142

- N. Floquet, S. Dedieu, L. Martiny, M. Dauchez, D. Perahia, Human thrombospondin's (TSP-1) C-terminal domains open to interact with the CD-47 receptor: a molecular modeling study. Arch. Biochem. Biophys. 478 (2008) 103-109

- P. Manna & W. Frazier, CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A. Cancer Res. 64(2004) 1026-36

- Y. Mirochnik, A. Kwiatek, O. Volpert, Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments Curr. Drug Targets 2008 9(10) 851-862

- G. Rath, C. Schneider, S. Dedieu, B. Rothhut, M. Soula-Rothhut, C. Ghoneim, B. Sid, H. Morjani, H. El Btaouri, L. Martiny, The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. Biochim. Biophys. Acta 1763 (2006) 1125-1134

- B. Sid, B. Langlois, H. Sartelet, G. Bellon, S. Dedieu, L. Martiny, Thrombospondin-1 enhances human thyroid carcinoma cell invasion through urokinase activity. Int. J. Biochem. Cell. Bio. 40 (2008) 1890-1900

- B. Sid, H. Sartelet, G. Bellon, H. El Btaouri, G. Rath, N. Delorme, B. Haye, L. Martiny, Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 49 (2004) 245-258

- T.Wang, X. Qian, M. Granick, M. Solomon, V. Rothman, D. Berger & Tuszynski, Inhibition of breast cancer progression by an antibody through a thrombospondin-1 receptor. Surgery 120 (1996a) 449-454

- T.Wang, X. Qian, M. Granick, M. Solomon, V. Rothman, D. Berger & Tuszynski, Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. J. Surg. Res. 63(1996b) 39-43

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0109]**

- <110> Universidad de Reims Champagne Ardenne
- <120> Péptido antagonista de la unión entre el CD47 y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas
- <130> 9U11 BT PCT 1
- <150> FR 1156237 <151> 2011-07-08
- <160> 2
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido antagonista de la unión entre el CD47 y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas
- <400> 1

Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser  
 1 5 10

ES 2 681 572 T3

<210> 2  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Péptido antagonista de la unión entre el CD47 y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas

<400> 2

Cys Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Cys  
1 5 10

10

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido antagonista de la unión entre un receptor CD47 y una proteína perteneciente a la familia de las trombospondinas, o TSP, **caracterizado porque** presenta la siguiente secuencia S1:

5 S1: R1-R2-R3-S-Q-L-L-K-G-R4-R5-R6

donde R1 a R6 corresponden a aminoácidos.

2. Péptido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** R1, R3 y R5 corresponden cada uno a un aminoácido apolar seleccionado entre la isoleucina (I) y/o la leucina (L) y/o la valina (V) y/o la alanina (A).

3. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** R2 y R4 corresponden cada uno a un aminoácido polar cargado negativamente seleccionado entre el ácido glutámico (E) y/o el ácido aspártico (D).

4. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** R6 corresponde a un aminoácido, polar y no cargado que comporta un radical hidroxilo seleccionado entre la serina (S) o la treonina (T).

5. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la secuencia S1 de dicho péptido es igual a la siguiente secuencia identificada como secuencia S2:

S2: I-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-S

6. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho péptido es ciclado.

7. Péptido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** es ciclado por medio de un puente disulfuro entre dos aminoácidos de tipo cisteína (C) y **porque** dicho péptido presenta la siguiente secuencia S1, identificada como secuencia S3:

S3: C-E-V-S-Q-L-L-K-G-D-A-C

8. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se obtiene por vía recombinante.

9. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** se obtiene por síntesis química.

10. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento del cáncer.

11. Péptido según la reivindicación 10 para el tratamiento del cáncer folicular de tiroides.

12. Péptido según la reivindicación 10 para el tratamiento del cáncer mamario.

13. Péptido según la reivindicación 10 para el tratamiento del melanoma.

14. Péptido una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para impedir la interacción entre la trombospondina-1 y el receptor CD47 e inhibir el efecto antiapoptótico de dicha interacción en las células cancerosas.

15. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para impedir la interacción entre la trombospondina-2 y el receptor CD47 e inhibir el efecto antiapoptótico de dicha interacción en las células cancerosas.

16. Ácido nucleico aislado que codifica un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

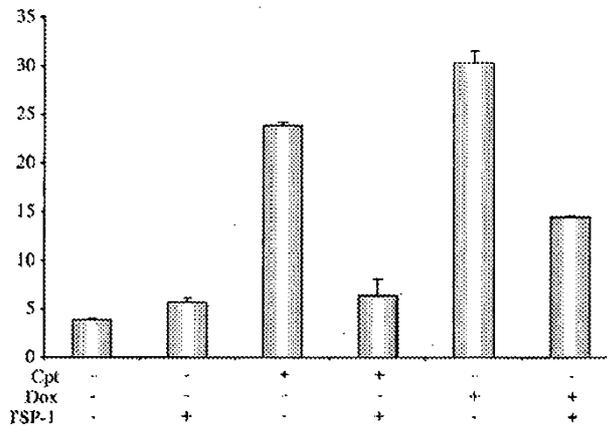


FIG. 1

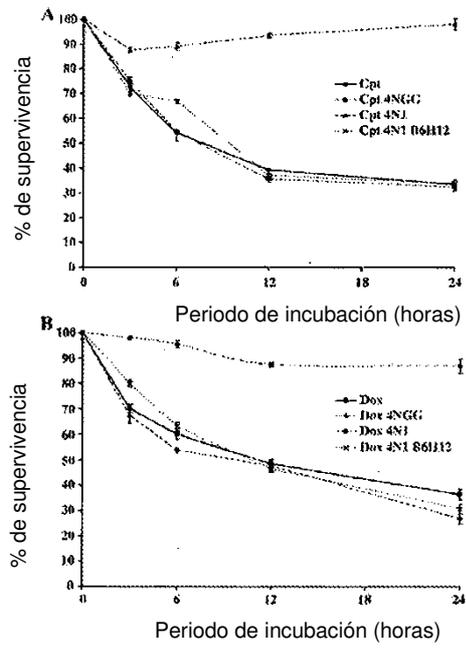


FIG. 2

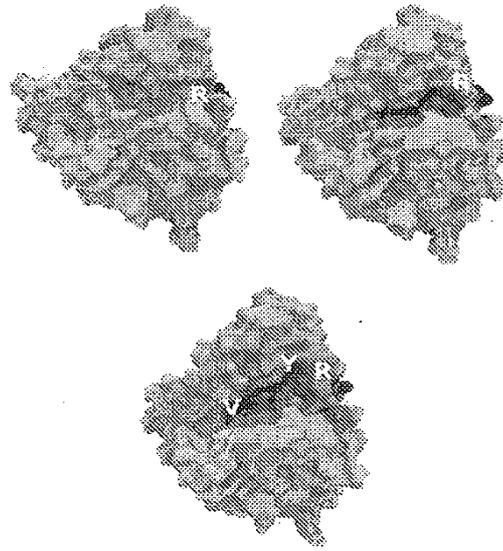


FIG. 3

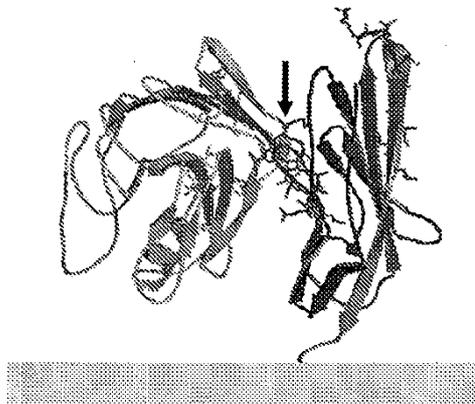


FIG. 4

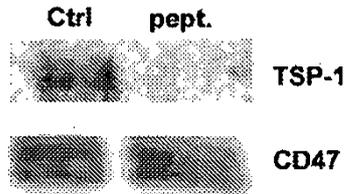


FIG. 5

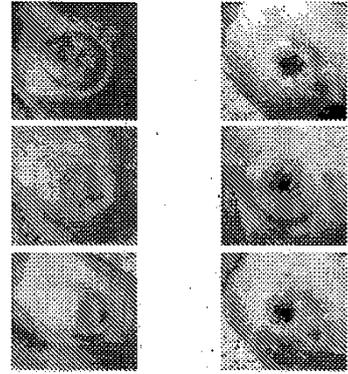


FIG. 6

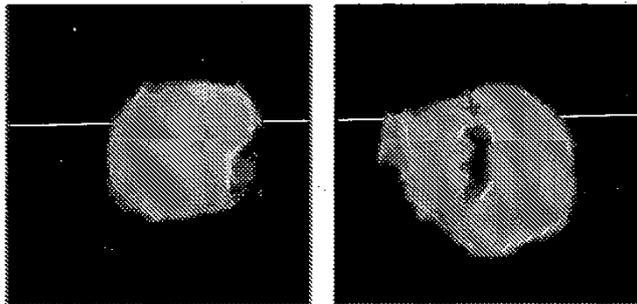


FIG. 7

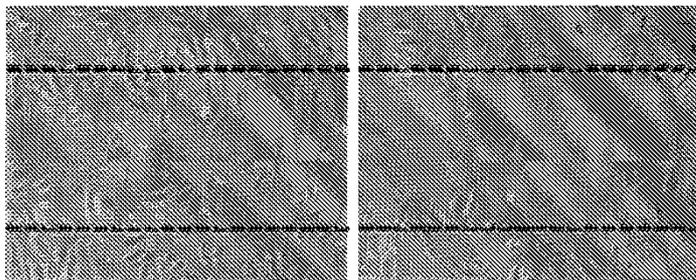


FIG. 8