

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 474**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2015 PCT/EP2015/053125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15121428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015 E 15704545 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3134428**

54 Título: **Fragmentos polipeptídicos de168A-T2 y composiciones que los comprenden para uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

14.02.2014 EP 14155243

14.02.2014 US 201461939932 P

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

25.02.2020

73 Titular/es:

**GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA (100.0%)
Parc Scientifique EPFL PSE-A
1015 Lausanne , CH**

72 Inventor/es:

**AL-MAHMOOD, SALMAN y
COLIN, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 744 474 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

Fragmentos polipeptídicos de 168A-T2 y composiciones que los comprenden para uso en el tratamiento del cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de tratamientos para enfermedades relacionadas con la angiogénesis, y más particularmente cánceres y/o tumores. La presente invención se refiere más específicamente a polipéptidos que poseen una actividad antiangiogénica para tratar cánceres y/o tumores en los que las células expresan el asociado 1 de CD9 (CD9P-1).

Antecedentes de la invención

La angiogénesis corresponde al proceso que permite que se formen nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis comienza con la activación de las células endoteliales e incluye la migración, proliferación y diferenciación de células endoteliales en capilares. Mientras que la angiogénesis es un proceso normal y vital en el crecimiento, el desarrollo y la cicatrización de heridas, este proceso también puede desempeñar un papel clave en la progresión de cánceres y tumores. De hecho, la formación de nuevos vasos sanguíneos a menudo es estimulada por las moléculas de señalización liberadas por los tumores, lo que mejora la red recién formada de vasos para suministrar nutrientes y oxígeno y eliminar productos de desecho. La angiogénesis inducida por tumor conduce así al crecimiento tumoral y posiblemente a la metástasis del mismo a sitios distantes. En consecuencia, el desarrollo de compuestos antiangiogénicos se ha convertido en un foco principal en el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Varias moléculas quimioterapéuticas dirigidas a la angiogénesis ya están disponibles en el mercado. Entre ellas, conocidas como inhibidores de la angiogénesis se incluyen angiostatina, endostatina, interferones, factor plaquetario 4, fragmento de prolactina de 16 kDa, trombospondina, TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteasa 1), TIMP-2 y TIMP-3, así como otros fármacos tales como, por ejemplo, combrestatina A4, EMD 121974, TNP-470, escualamina, talidomida, interferón alfa, anticuerpos anti-VEGF. Sin embargo, su eficiencia sigue siendo insuficiente, y su uso suele ir acompañado de efectos secundarios nocivos. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de tratamientos alternativos, que tengan una mayor eficiencia, sean menos invasivos o tóxicos y resulten en una mayor tasa de recuperación.

El documento WO 03/080105 describe cinco genes implicados en la regulación de la angiogénesis y más específicamente el gen "168" que codifica "proteína 168A", también conocido como Asociado 1 de CD9 "CD9P-1". El documento WO 03/080105 en particular describe que la proteína 168A está implicada en la activación de la angiogénesis y se expresa en células endoteliales estimuladas con factores proangiogénicos, como por ejemplo TNF-alfa. El documento WO 03/080105 también describe que inhibir la expresión del gen 168 da como resultado la inhibición de la formación de tubos capilares.

El documento WO 2008/138894 describe diversas formas truncadas de la proteína 168A, entre las cuales la proteína 168A-T2 corresponde a un fragmento del dominio extracelular de la proteína 168A. El documento WO 2008/138894 describe además que la proteína 168A-T2 (identificada en lo sucesivo como la SEQ ID NO: 3) puede inhibir tanto la proliferación de células endoteliales humanas *in vitro* como la formación de tubos capilares *in vitro*, de una forma dependiente de la dosis. Además, esta solicitud describe que 168A-T2 puede inducir la inhibición de la migración de células endoteliales *in vitro*, de una forma dependiente de la dosis. De acuerdo con los resultados descritos en el documento WO 2008/138894, 168A-T2 aparece así como un potente compuesto antiangiogénico, al menos 600 veces más potente que los péptidos identificados con base en mAb VEGF y/o el receptor de VEGF (KDR). Finalmente, el documento WO 2008/138894 describe que la proteína 168A-T2 tiene una fuerte actividad antitumoral *in vivo* y una fuerte actividad sinérgica en combinación con otro agente quimioterapéutico tal como, por ejemplo, cisplatino.

Además, se demostró que un tratamiento de ratones desnudos xenoinjertados NCI-H460 con GS-168AT2 (una forma etiquetada de 168A-T2) conduce a una inhibición drástica del crecimiento tumoral y a la subregulación *in vivo* de CD9 en tumores (Guilmain et al., 2011, British Journal of Cancer, 104: 496-504).

CD9 es la tetraspanina más estudiada: se sabe que funciona en múltiples eventos celulares, incluyendo fusión de membrana, diferenciación y motilidad celular, y parece tener un papel clave en la metástasis. Las observaciones clínicas sugieren que la subregulación de CD9 está asociada con la progresión de tumores sólidos. Las tetraspaninas componen una familia de proteínas con cuatro dominios transmembrana que delimitan dos dominios extracelulares de tamaño desigual, que están involucrados en numerosos procesos fisiológicos que incluyen angiogénesis, migración celular, contacto célula-célula y fusión. Se cree que la función de las tetraspaninas está relacionada con su capacidad de interactuar entre sí y con otras proteínas de superficie, formando una red de interacciones moleculares denominada red de tetraspanina. El asociado 1 de CD9 (también conocido como "CD9P-1", "FPRP" o "EWI-F") se asocia con CD9, CD81 y CD151 y, por lo tanto, se localiza en la red de tetraspaninas.

Se demostró además que la expresión de CD9P-1 es esencial para la angiogénesis, y que la proteína GS-168AT2 (una forma truncada de CD9P-1) inhibe la proliferación, la migración, la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* de células endoteliales humanas (hEC) en una forma dependiente de la dosis, así como el crecimiento tumoral *in vivo*. Se propuso en particular que GS-168AT2 ejerce su acción mediante subregulación de CD9 y CD151 en la superficie

celular, en la reducción de la expresión de CD9P-1 (Colin et al., 2011, British Journal of Cancer, 105: 1002-1011).

Se demostró que 168A-T2 induce fuertes perturbaciones de la red de tetraspaninas, al desencadenar la degradación de CD9, CD151 y CD9P-1. Por lo tanto, es de interés proporcionar una solución terapéutica que se dirija específicamente a una sola tetraspanina.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que dos péptidos (en adelante P3 y P4, de las SEQ ID NO: 1 y 2 respectivas) comprendidos dentro de la secuencia de 168A-T2 poseen en realidad una actividad antiangiogénica propia. Los datos presentados a continuación demuestran que estos péptidos pueden usarse como agente antitumoral primario o como terapia sinérgica complementaria a los agentes citotóxicos primarios para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis, y más específicamente para tratar cánceres y/o tumores. Sorprendentemente, se demostró que dichos péptidos desencadenan la degradación de CD 151 solamente, sin modificar los niveles celulares de CD9 y CD9P-1, lo que limita los efectos nocivos resultantes de la desestructuración de la red de tetraspanina (como se obtiene con 168A-T2). Además, dichos péptidos demostraron ventajosamente que ejercen su actividad inhibitoria solo cuando las células están en un estado angiogénico (es decir, solo cuando las células expresan CD9P-1), en forma contraria a los anticuerpos anti-CD 151 del estado de la técnica. Por lo tanto, los péptidos P3 y P4 constituyen alternativas inesperadas y ventajosas a los tratamientos contra el cáncer conocidos hasta la fecha, ya que son, por ejemplo, capaces de inducir la expresión de endostatinas, un inhibidor principal de la angiogénesis, sin los inconvenientes de la endostatina recombinante (dificultad para producir en grandes cantidades, pérdida de actividad biológica tras el almacenamiento a largo plazo, administración a pacientes que produce efectos secundarios, etc).

Resumen

La presente invención se refiere por lo tanto a un polipéptido, caracterizado porque comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un péptido de secuencia GNYCYCVTPWVKS (SEQ ID NO: 1);
- (ii) un péptido de secuencia IHSKPVFITVKMDVLNA (SEQ ID NO: 2);
- (iii) un fragmento funcional de las SEQ ID NO: 1 o 2; y
- (iv) un derivado funcional de las SEQ ID NO: 1 o 2, en el que dicho derivado corresponde a las SEQ ID NO: 1 o 2 modificado por la adición de uno o más grupos funcionales seleccionados de un grupo fosfato, acetato, lípido o carbohidrato, y/o mediante la adición de uno o más grupos protectores; y,

en el que dicho fragmento funcional tiene la misma función antiangiogénica que las SEQ ID NO: 1 o 2; y, en el que dicho polipéptido comprende menos de 50, preferiblemente menos de 40, preferiblemente menos de 30, preferiblemente menos de 20 aminoácidos contiguos de una SEQ ID NO: 3.

En una realización, el polipéptido de la invención tiene una actividad antiangiogénica.

En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende tanto un péptido de la SEQ ID NO: 1 como un péptido de la SEQ ID NO: 2. En una realización específica de la invención, el polipéptido consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica de la invención, el polipéptido consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 2.

En una realización de la invención, dicho polipéptido se modifica mediante la adición de uno o más grupos funcionales tales como un grupo fosfato, acetato, lípido o carbohidrato, y/o mediante la adición de uno o más grupos protectores.

En una realización, dicho polipéptido posee además actividad antitumoral.

La presente invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un polipéptido como se definió anteriormente.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o un polinucleótido como se definió anteriormente.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o un polinucleótido como se definió anteriormente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende además al menos un agente citotóxico, quimioterapéutico o anticancerígeno. En una realización particular de la invención, la composición farmacéutica comprende además un complejo de platino seleccionado del grupo que consiste en cisplatino.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende además al menos un agente

antiangiogénico.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende:

- 5 - un polipéptido que comprende un péptido de la SEQ ID NO: 1 y un péptido de la SEQ ID NO: 2; o
- un primer polipéptido que comprende un péptido de la SEQ ID NO: 1, y un segundo polipéptido que comprende un péptido de la SEQ ID NO: 2.

10 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica de la invención, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención está en la forma adecuada para administración tópica, sistémica, oral, subcutánea, transdérmica, intramuscular o intraperitoneal.

15 La invención se refiere además a un polipéptido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.

En una realización, la enfermedad relacionada con la angiogénesis se selecciona de enfermedades neovasculares oculares, aterosclerosis, artritis, psoriasis, obesidad y enfermedad de Alzheimer.

20 En una realización particular, la enfermedad neovascular ocular se selecciona de retinopatía isquémica, retinopatía diabética, retinopatía o prematuridad, oclusiones de venas retinianas, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal y glaucoma neovascular.

25 En una realización, la invención se refiere a un polipéptido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer y/o de tumores en el cuerpo humano o animal.

En una realización, la invención se refiere a un polipéptido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de un cáncer y/o tumor en el que las células cancerosas expresan CD9P-1.

30 En una realización, la invención se refiere a un polipéptido o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un cáncer y/o tumor en un sujeto que lo necesita en el que las células cancerosas expresan CD9P-1, en el que antes del tratamiento, la expresión de CD9P-1 se prueba en una muestra que comprende células cancerosas y/o tumorales del sujeto.

35 Descripción detallada

Por lo tanto, esta invención se refiere a un polipéptido caracterizado porque dicho polipéptido comprende o consiste en la secuencia de péptidos GNYYCSVTPWVKS (P3 - SEQ ID NO: 1); IHSKPVFITVKMDVLNA (P4 - SEQ ID NO: 2); o es un fragmento funcional o variante o derivado del mismo; y en el que dicho polipéptido comprende menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13 aminoácidos contiguos de una SEQ ID NO: 3.

En una realización, el polipéptido de la invención tiene una actividad antiangiogénica.

45 Como se usa en el presente documento, el término "fragmento funcional" de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 se refiere a un fragmento de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 que tiene la misma función que la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, preferiblemente que tiene la misma actividad antiangiogénica de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

50 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" significa moléculas formadas a partir de la unión, en un orden definido, de aminoácidos y de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75 a 100 aminoácidos. Un polipéptido "aislado" de acuerdo con la invención se refiere a uno que se ha removido de su entorno natural o a uno que ha sido diseñado por un experto en la materia.

55 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una longitud de al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 100 aminoácidos.

60 En una realización, el polipéptido de la invención comprende (o consiste en) de 13 a 50 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 13 a 40 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 13 a 30 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 13 a 25, 24, 23, 22 o 21 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 13 a 20 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 13 a 19, 18, 17, 16, 15 o 14 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) 13 aminoácidos.

65

5 En otra realización, el polipéptido de la invención comprende (o consiste en) de 17 a 50 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 17 a 40 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 17 a 30 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 17 a 25, 24, 23, 22 o 21 aminoácidos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende (o consiste en) de 17 a 20, 19 o 18 aminoácidos.

10 En una realización de la invención, dicho péptido tiene una longitud de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13 aminoácidos y comprende la secuencia de péptidos SEQ ID NO: 1, en la que dicho polipéptido comprende menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13 aminoácidos contiguos de una SEQ ID NO: 3.

10 En otra realización de la invención, dicho péptido tiene una longitud de 50, 40, 30, 25, 22, 20, 19, 18, 17 aminoácidos y comprende la secuencia de péptidos SEQ ID NO: 2, en la que dicho polipéptido comprende menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17 aminoácidos contiguos de una SEQ ID NO: 3.

15 En una realización, el polipéptido de la invención comprende la SEQ ID NO: 1 y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en el terminal C, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en el terminal N.

20 Como se usa en este documento, los "aminoácidos" están representados por su nombre completo, su código de tres letras o su código de una letra, como se conoce bien en la técnica. Los residuos de aminoácidos en los péptidos se abrevian como sigue: fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; La metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G.

25 Como se usa en el presente documento, el término "aminoácidos" incluye aminoácidos tanto naturales como sintéticos, y ambos aminoácidos D y L. "Aminoácido estándar" o "aminoácido natural" significa cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar comúnmente encontrados en péptidos naturales. Por "residuo de aminoácido no estándar" se entiende cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara sintéticamente o se deriva de una fuente natural. Por ejemplo, la naftilalanina se puede sustituir por triptófano para facilitar la síntesis. Otros aminoácidos sintéticos que se pueden sustituir incluyen, pero no se limitan a, L-hidroxiopropilo, L-3,4-dihidroxifenilalanilo, alfa-aminoácidos como L-alfa-hidroxisililo y D-alfa-metilalanilo, L-alfa-metilalanilo, beta-aminoácidos e isoquinolilo.

35 Como se usa en el presente documento, "aminoácido" también abarca aminoácidos modificados químicamente, que incluyen, pero no se limitan a, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y sustituciones. Los aminoácidos contenidos dentro de los polipéptidos de la presente invención, y particularmente en el terminal carboxilo o amino, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la vida media en circulación del polipéptido sin afectar negativamente su actividad. Además, un enlace disulfuro puede estar presente o ausente en los polipéptidos de la invención.

40 Los polipéptidos de la invención pueden comprender aminoácidos estándar naturales o aminoácidos no estándar. Los miméticos de polipéptidos incluyen polipéptidos que tienen las siguientes modificaciones: i) polipéptidos en los que uno o más de los enlaces (uniones) peptidil-C(O)NR- han sido reemplazados por un enlace no peptidilo tal como un enlace -CH₂-carbamato (-CH₂OC(O)NR-), un enlace fosfonato, un enlace -CH₂-sulfonamida (-CH₂-S(O)₂NR-), un enlace urea (-NHC(O)NH-), un enlace -CH₂-amina secundaria, o con un enlace peptidilo alquilado (-C(O)NR-) en el que R es alquilo C₁-C₄; ii) polipéptidos en los que el terminal N se deriva a un grupo -NRR¹, a un grupo -NRC(O)R, a un grupo -NRC(O) OR, a un grupo -NRS(O)₂R, a un grupo -NHC(O)NHR en el que R y R¹ son hidrógeno o alquilo C₁-C₄ con la condición de que R y R¹ no sean ambos hidrógeno; iii) polipéptidos en los que el terminal C se deriva a -C(O)R² en el que R² se selecciona del grupo que consiste en alcoxi C₁-C₄ y -NR³R⁴ en el que R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₄.

55 En una realización, el polipéptido de la invención comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o una variante de las mismas. En una realización, una variante de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 tiene una actividad antiangiogénica, preferiblemente una actividad antiangiogénica equivalente a aquella de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

55 En una realización, una variante de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 comprende sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

60 Como se usa en este documento, el término "sustitución conservadora de aminoácidos" se define aquí como un intercambio de aminoácidos dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

- 65 I. Pequeños residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
 II. Residuos polares, cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
 III. Residuos polares cargados positivamente: His, Arg, Lys;
 IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys;
 V. Residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

En otra realización, una variante de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 es un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, preferiblemente de al menos 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 respectivamente.

5 En otra realización, una variante de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 es un polipéptido en el que 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 está/están ausentes respectivamente, o están sustituidas por cualquier aminoácido, o en la que se añade/añaden 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos (contiguos o no).

10 El término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencia entre polipéptidos, de acuerdo con lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si los hay) abordadas por un modelo matemático o programa de ordenador en particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48,1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para obtener la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programa de ordenador preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programa GCG, que incluye GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res./2, 387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., citado anteriormente). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

30 Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden producirse sintéticamente por síntesis química o síntesis enzimática, como es bien conocido en la técnica. Alternativamente, las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención pueden introducirse en un vector de expresión de proteínas y producirse en un organismo huésped adecuado (por ejemplo, bacterias, células de insectos, etc.) y luego purificarse. Se puede agregar un polipéptido adicional ("etiqueta") con el fin de purificar o identificar o purificar los polipéptidos. Las etiquetas de proteínas hacen posible, por ejemplo, que los polipéptidos se adsorban, con alta afinidad, a una matriz, y que la matriz se lave rigurosamente con reguladores adecuados sin que el complejo se eluya en un grado significativo, y para que el complejo adsorbido sea eluido selectivamente posteriormente. Los ejemplos de etiquetas de proteínas que conocen los expertos en la materia son una etiqueta (His)₆, una etiqueta Myc, una etiqueta FLAG, una etiqueta de hemaglutinina, una etiqueta de glutatión transferasa (GST), inteína que tiene una etiqueta de afinidad de unión a quitina o una etiqueta de proteína de unión maltosa (MBP). Estas etiquetas de proteínas se pueden ubicar en el terminal N, en el terminal C, y/o internamente.

45 En una realización de la invención, los polipéptidos como se describen en el presente documento anteriormente se modifican por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante la adición de uno o más grupos funcionales tales como un grupo fosfato, acetato, lípido o carbohidrato, y/o mediante la adición de uno o más grupos protectores.

50 Por ejemplo, los polipéptidos pueden modificarse mediante la adición de uno o más grupos funcionales tales como fosfato, acetato o diversos lípidos y carbohidratos. Los polipéptidos de la invención también pueden existir como derivados de polipéptidos. El término "derivado de polipéptido" se refiere al compuesto que tiene un grupo amino (-NH-), y más particularmente, un enlace peptídico. Los polipéptidos pueden considerarse como amidas sustituidas. Al igual que el grupo amida, el enlace peptídico muestra un alto grado de estabilización de resonancia. El enlace sencillo C-N en el enlace peptídico tiene típicamente alrededor del 40 por ciento de carácter de doble enlace y el enlace doble C=O alrededor del 40 por ciento de carácter de enlace sencillo. Los "grupos protectores" son aquellos grupos que evitan reacciones indeseables (como la proteólisis) que implican grupos funcionales no protegidos. Los ejemplos específicos de grupos protectores de amino incluyen formilo; trifluoroacetilo; benciloxicarbonilo; benciloxicarbonilo sustituido tal como (orto- o para-)clorobenciloxicarbonilo y (orto- o para-)bromobenciloxicarbonilo; y oxicarbonilo alifático tal como t-butoxicarbonilo y t-amiloxicarbonilo. Los grupos carboxilo de aminoácidos pueden protegerse mediante conversión en grupos éster. Los grupos éster incluyen bencil ésteres, bencil ésteres sustituidos tales como metoxibencil éster; alquil ésteres tales como ciclohexil éster, cicloheptil éster o t-butil éster. La fracción guanidino puede estar protegido por nitro; o arilsulfonilo tal como tosilo, metoxibencenosulfonilo o mesitilensulfonilo, aunque no necesita un grupo protector. Los grupos protectores de imidazol incluyen tosilo, bencilo y dinitrofenilo. El grupo indol de triptófano puede estar protegido por formilo o puede no estar protegido.

65 La modificación de los polipéptidos tiene como objetivo particular mejorar su tiempo de vida *in vivo*. Un tipo de modificación es la adición a los terminales N o C de los polipéptidos de polietilenglicol (PEG). El experto en la materia

sabe que el PEG tiene muchas propiedades que lo convierten en un vehículo ideal para polipéptidos tales como alta solubilidad en agua, alta movilidad en solución y baja inmunogenicidad. Esta modificación también protege a los polipéptidos de las exopeptidasas y, por lo tanto, aumenta su estabilidad general *in vivo*.

5 Las otras modificaciones usadas para prevenir la degradación de los polipéptidos por endopeptidasas o exopeptidasas incluyen modificaciones del terminal N tales como acetilación o glicosilación, modificaciones del terminal C tales como amidación y el uso de aminoácidos no naturales (β -aminoácidos y α -trifluorometil aminoácidos) en sitios particulares dentro de los polipéptidos.

10 Otra alternativa para aumentar el tamaño molecular del polipéptido es la fusión genética de los polipéptidos al dominio de Fc de la inmunoglobulina gamma humana o la fusión de los polipéptidos a la albúmina.

En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende tanto un péptido de la SEQ ID NO: 1 como un péptido de la SEQ ID NO: 2. En una realización, el polipéptido de la invención comprende un péptido de la SEQ ID NO: 1 fusionado a un péptido de la SEQ ID NO: 2. En una realización, el polipéptido de la invención comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 separadas por un enlazador, correspondiente a una secuencia de aminoácidos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos. En una realización, la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 están en la misma orientación en el polipéptido de la invención. En otra realización, la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 están en orientaciones opuestas en el polipéptido de la invención.

20 En otra realización específica de la invención, el polipéptido consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica de la invención, el polipéptido consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, el polipéptido de la invención consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1 o 2 y está pegilado.

25 Otro objetivo de la invención es una composición que comprende al menos un polipéptido de la invención.

Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los polipéptidos como se describió en el presente documento anteriormente en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 Otro objetivo de la invención es un medicamento que comprende al menos un polipéptido de la invención.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos y composiciones que pueden administrarse a mamíferos sin toxicidad indebida. Por consiguiente, un "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que no produce una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un animal, preferiblemente un ser humano. Incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción y similares. Para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por las oficinas reguladoras, tales como, por ejemplo, la Oficina de la FDA o EMA.

40 Los excipientes adecuados incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y soluciones de etanol, glucosa, sacarosa, dextrano, manosa, manitol, sorbitol, polietilenglicol (PEG), fosfato, acetato, gelatina, colágeno, Carbopol®, aceites vegetales y similares. Se pueden incluir adicionalmente conservantes, estabilizantes, antioxidantes, antimicrobianos y agentes reguladores adecuados, tales como, por ejemplo, BHA, BHT, ácido cítrico, ácido ascórbico, tetraciclina y similares.

45 Otros ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias reguladoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

50 En una realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención puede comprender algunos excipientes, tales como, por ejemplo, tensioactivos (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa); vehículos adecuados, tales como, por ejemplo, disolventes y medios de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales, tales como, por ejemplo, aceite de maní y aceite de sésamo; agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio; agentes de recubrimiento, tales como, por ejemplo, lecitina; agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina; conservantes, tales como, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares; reguladores, tales como, por ejemplo, ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares; agentes de tonicidad, tales como, por ejemplo, dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio; antioxidantes y estabilizantes, tales como, por ejemplo, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares; agentes humectantes o

clarificantes no iónicos, tales como, por ejemplo, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol; agentes modificadores de la viscosidad, tales como, por ejemplo, dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetil propilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetil celulosa; y similares.

5 En una realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento puede comprender una sal farmacéuticamente aceptable del polipéptido.

10 Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos, sales con aminoácidos básicos o ácidos y similares. Los ejemplos de la sal con una base inorgánica incluyen sales de metales alcalinos, tales como una sal de sodio y una sal de potasio; una sal de metal alcalinotérreo tal como una sal de calcio y una sal de magnesio; una sal de aluminio; y una sal de amonio. Los ejemplos de la sal con una base orgánica incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, dicitclohexilamina y N,N'-dibencil etilendiamina. Los ejemplos de la sal con un ácido inorgánico incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Los ejemplos de la sal con un ácido orgánico incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico. Los ejemplos de la sal con un aminoácido básico incluyen sales con arginina, lisina y ornitina. Los ejemplos de la sal con un aminoácido ácido incluyen sales con ácido aspártico y ácido glutámico. La lista de sales adecuadas se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., página 1418, 1985, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento por referencia.

25 En una realización, la cantidad de polipéptido presente en el medicamento, composición o composición farmacéutica es eficaz para tratar una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente para tratar cáncer y/o tumores y/o cánceres susceptibles y/o tumores susceptibles. Preferiblemente, el polipéptido está presente en una cantidad de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente de 0,1% a 10% en peso, más preferiblemente de 1% a 5% en peso, en el medicamento o en la composición. Estas cantidades son habitualmente adaptables por el hombre en la técnica, que puede elegir la mejor cantidad para administrar a un paciente para lograr la recuperación.

30 En una realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende al menos 10 mg del polipéptido como se describió anteriormente, preferiblemente al menos 20 mg, más preferiblemente al menos 50 mg. En una realización preferida, la composición, composición farmacéutica o medicamento comprende de 10 a 3000 mg del polipéptido de la invención, preferiblemente de 50 a 2000 mg, más preferiblemente de 100 a 1500 mg.

35 En una realización particular, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende un polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1. En otra realización específica de la invención, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención, comprende un polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 2. En otra realización específica de la invención, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende un polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1 o 2, estando dicho péptido pegilado

40 En una realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende un polipéptido como se describió anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido comprende dos péptidos, un péptido de la SEQ ID NO: 1 y un péptido de la SEQ ID NO: 2.

45 En otra realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende dos polipéptidos, un primer polipéptido que comprende un péptido de la SEQ ID NO: 1, y un segundo polipéptido que comprende un péptido de la SEQ ID NO: 2. En otra realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende dos polipéptidos, un primer polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1 y un segundo polipéptido que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 2.

50 En una realización, el polipéptido de la invención es el único ingrediente activo comprendido en la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención.

55 En otra realización, la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención comprende además otro ingrediente activo, y el polipéptido de la invención puede ser, por lo tanto, un agente terapéutico añadido a dicho otro ingrediente activo.

60 En una realización particular de la invención, la composición, composición farmacéutica o medicamento comprende además un agente citotóxico, quimioterapéutico o anticancerígeno.

65 Los ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida (CTX; por ejemplo, CYTOXAN®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, LEUKERAN®), cisplatino (CisP; por ejemplo, PLATINOL®), oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN^{MR}),

busulfano (por ejemplo, MYLERAN®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptoizotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C y similares; antimetabolitos, tales como, por ejemplo, metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo, VEPESID®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo, XELODA®), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos, tales como, por ejemplo, actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo, ADRIAMYCIN®), daunorrubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como, por ejemplo, alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vincristina (VCR), vinblastina, y similares; y otros agentes antitumorales, tales como, por ejemplo, paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y derivados de paclitaxel, agentes citostáticos, glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo, DECADRON®) y corticosteroides como, por ejemplo, prednisona, inhibidores de enzimas nucleósidas tales como, por ejemplo, hidroxiaurea, enzimas que agotan los aminoácidos tales como, por ejemplo, asparaginasa, leucovorina, ácido folínico, raltitrexed y otros derivados del ácido fólico, y agentes antitumorales similares y diversos. Los siguientes agentes también pueden usarse como agentes adicionales: amifostina (por ejemplo, ETHYOL®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptoizocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo, DOXIL®), gemcitabina (por ejemplo, GEMZAR®), daunorrubicina lipo (por ejemplo, DAUNOXOME®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, TAXOTERE®), aldesleuquina, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, mitoxantrona, topotecano, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, o clorambucilo.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además un complejo de platino. Dicho complejo de platino puede seleccionarse del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino, lipoplatino y una combinación de los mismos.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la invención y cisplatino. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la invención y carboplatino.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (P3) y cisplatino. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 (P4) y cisplatino. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (P3), un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 (P4) y cisplatino. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (P3) y carboplatino. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 (P4) y carboplatino. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención es un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (P3), un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 (P4) y carboplatino.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende además un agente antiangiogénico. Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, anti-VEGF-A, anti-VEGFR (VEGFR-1, VEGFR-2 o VEGFR-3), anti-PDGFR (α o β), anti-EGFR, anti-c-KIT. En una realización, dicho agente antiangiogénico puede seleccionarse del grupo que consiste en bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib, trampa de VEGF, axitinib, imatinib, vatalanib, sorafenib, semaxanib, sunitinib, vandetanib, angiostatina, endostatina, trombospondina-1 y combinación de los mismos.

Otro objetivo de la invención es un polipéptido como se describió en el presente documento anteriormente o una composición farmacéutica como se describió en el presente documento anteriormente para tratar una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente para tratar cáncer y/o tumores en el cuerpo humano o animal. En una realización, la invención se refiere a un polipéptido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de un cáncer y/o tumor en el que las células cancerosas expresan CD9P-1.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye la profilaxis del trastorno o afección específica, o el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específica y/o prevenir o eliminar dichos síntomas. En una realización, el término "tratamiento" se refiere por lo tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas; en el que el objetivo es prevenir o disminuir (hacer más lento) la condición o trastorno patológico objetivo. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno. Un sujeto o mamífero es "tratado" con éxito para una infección si, después de recibir una cantidad terapéutica de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en o la ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en la cantidad de células patógenas; reducción en el porcentaje de células totales que son patógenas; y/o alivio, en cierta medida, de uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad o afección específica; reducción de la morbilidad y mortalidad, y mejora en la calidad de vida. Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento exitoso y la mejora de la enfermedad se pueden medir fácilmente mediante procedimientos de rutina familiares para un médico.

Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad o exhibe solo signos tempranos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad. Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe

signos de patología con el propósito de disminuir o eliminar esos signos.

5 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto. En una realización, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere así a la cantidad de un polipéptido de la invención que es necesaria y suficiente para ralentizar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de uno o más síntomas de la enfermedad o afección; aliviar los síntomas de la enfermedad o afección; curar la enfermedad o condición.

10 Otro objetivo de la divulgación es un método para tratar una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los polipéptidos de la invención.

15 En una realización, el método de la divulgación es un método para inhibir la angiogénesis, tratando así una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor. En otra realización, el método de la divulgación es un método para inhibir la proliferación, migración y/o diferenciación de células endoteliales en capilares, tratando así una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor. En otra realización, el método de la divulgación es un método para aumentar la producción de endostatina, tratando así una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor.

20 En otra realización, el método de la divulgación es un método para inhibir el crecimiento tumoral y/o limitar o disminuir el volumen tumoral, tratando así un cáncer y/o tumor. En otra realización, el método de la divulgación es un método para desencadenar la degradación de CD151 mientras se dejan sin cambios los niveles celulares de CD9, CD9P-1 y CD81, tratando así un cáncer y/o tumor, preferiblemente un cáncer y/o tumor en el que las células cancerosas y/o tumorales expresan CD9P-1. En otra realización, el método de la divulgación es un método para disminuir o inhibir las interacciones entre CD9P-1 y CD9, y/o entre CD9P-1 y CD151, y/o entre CD9 y CD151, tratando así un cáncer y/o tumor, preferiblemente un cáncer y/o tumor en el que las células cancerosas y/o tumorales expresan CD9P-1.

25 Otro objetivo de la invención es un polipéptido, una composición, una composición farmacéutica o un medicamento como se describió anteriormente para el tratamiento o para el uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente en el tratamiento del cáncer y/o de tumores

30 En una realización preferida, dicho polipéptido, composición, composición farmacéutica o medicamento es para uso en el tratamiento de un cáncer y/o tumor en el que las células cancerosas expresan CD9P-1. En una realización, la expresión de CD9-P1 se prueba en una muestra que comprende células cancerosas y/o tumorales obtenidas del sujeto antes del tratamiento.

35 En una realización, dicho polipéptido, composición, composición farmacéutica o medicamento es para usar en la inhibición de la angiogénesis, tratando de ese modo una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor. En otra realización, dicho polipéptido, composición o medicamento se usa para inhibir la proliferación, migración y/o diferenciación de células endoteliales en capilares, tratando así una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor. En otra realización, dicho polipéptido, composición o medicamento es para usar en el aumento de la producción de endostatina, tratando así una enfermedad relacionada con la angiogénesis, preferiblemente un cáncer y/o tumor.

40 En otra realización, dicho polipéptido, composición, composición farmacéutica o medicamento se usa para inhibir el crecimiento tumoral y/o limitar o disminuir el volumen tumoral, tratando de ese modo un cáncer y/o tumor. En otra realización, dicho polipéptido, composición o medicamento se usa para desencadenar la degradación de CD151 mientras se dejan sin cambios los niveles celulares de CD9, CD9P-1 y CD81, tratando así un cáncer y/o tumor, preferiblemente un cáncer y/o tumor en donde las células cancerosas y/o tumorales expresan CD9P-1. En otra realización, dicho polipéptido, composición o medicamento es para usar en la disminución o inhibición de interacciones entre CD9P-1 y CD9, y/o entre CD9P-1 y CD151, y/o entre CD9 y CD151, tratando así un cáncer y/o tumor, preferiblemente un cáncer y/o tumor en el que las células cancerosas y/o tumorales expresan CD9P-1.

45 De acuerdo con la invención, el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano. "Dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a un nivel de dosificación suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Preferiblemente, esta dosis o cantidad será suficiente para aliviar la condición cancerosa al matar las células cancerosas, pero también para un efecto que resulte en la inhibición del crecimiento y/o metástasis del cáncer.

50 En una realización, el método comprende la administración de al menos 10 mg del polipéptido como se describió en el presente documento anteriormente, preferiblemente al menos 20 mg, más preferiblemente al menos 50 mg. En una realización preferida, el método de la invención comprende la administración del polipéptido de la invención de 10 a 3000 mg, preferiblemente de 50 a 2000 mg, más preferiblemente de 100 a 1500 mg.

60 En una realización, el polipéptido, la composición, la composición farmacéutica o el medicamento para uso de acuerdo

- con la invención se administra en una cantidad de al menos 10 mg, preferiblemente al menos 20 mg, más preferiblemente al menos 50 mg. En una realización preferida, el polipéptido, la composición, la composición farmacéutica o el medicamento para uso de acuerdo con la invención se administra en una cantidad de 10 a 3000 mg, preferiblemente de 50 a 2000 mg, más preferiblemente de 100 a 1500 mg.
- 5 En un aspecto de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptido, composición, composición farmacéutica o medicamento de acuerdo con la invención varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 40 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/kg/día.
- 10 En una realización, el polipéptido, la composición, la composición farmacéutica o el medicamento para uso de acuerdo con la invención se administra una o dos veces al día, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 veces por semana. En una realización particular, el polipéptido, la composición o el medicamento para uso de acuerdo con la invención se administran todos los días durante al menos 7 días, preferiblemente al menos 10 días, más preferiblemente al menos 12 días.
- 15 Los cánceres que pueden ser tratados por los péptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a:
- Cáncer cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomioma, liposarcoma), mixoma, rhabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma;
- 20 Cáncer de pulmón: de pulmón de células no pequeñas, carcinoma broncogénico (células escamosas, células pequeñas indiferenciadas, células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma de condromatosis, mesotelioma;
- 25 Cáncer gastrointestinal: de esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomioma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado, adenocarcinoma tumores, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomioma), colon, colorrectal, rectal;
- 30 Cáncer del tracto genitourinario: de riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatosos, lipoma);
- 35 Cáncer de hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma;
- 40 Cáncer de hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, cordoma de tumor de células gigantes malignas, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes;
- 45 Cáncer del sistema nervioso: de cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningioma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma);
- 50 Cáncer ginecológico: de útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células de la granulosa, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides [rhabdomioma embrionario], trompas de Falopio [carcinoma]);
- 55 Cáncer hematológico: de sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [linfoma maligno];
- 60 Cáncer de piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y
- Cáncer de glándulas suprarrenales: neuroblastoma.
- 65 Los cánceres que pueden tratarse con los péptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a: mama, próstata, colon, colorrectal, pulmón, pulmón de células no pequeñas, cerebro, testicular, estómago,

páncreas, piel, intestino delgado, intestino grueso, garganta, cabeza y cuello, oral, hueso, hígado, vejiga, riñón, tiroides y sangre.

5 Los cánceres que pueden tratarse con los péptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen: mama, próstata, colon, ovario, colorrectal, pulmón y de pulmón de células no pequeñas.

Los cánceres que pueden tratarse con los péptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen: mama, colon (colorrectal) y pulmón (de pulmón de células no pequeñas).

10 Los cánceres que pueden tratarse con los péptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen: linfoma y leucemia.

15 Los cánceres que pueden tratarse con los péptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen cánceres relacionados con la angiogénesis tales como carcinoma de mama, carcinomas de vejiga, carcinomas de colon, tumores de cavidad oral, tumores avanzados, leucemia de células pilosas, melanoma, avanzados de cabeza y cuello, células renales metastásicas, linfoma no Hodgkin, mama metastásica, adenocarcinoma de mama, melanoma avanzado, pancreático, gástrico, glioblastoma, de pulmón, de ovario, de pulmón de células no pequeñas, de próstata, de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, varios tumores sólidos, mieloma múltiple, de próstata metastásica, glioma maligno, cáncer renal, linfoma, enfermedad metastásica refractaria, mieloma múltiple refractario, 20 cáncer cervical, sarcoma de Kaposi, glioma anaplásico recurrente y cáncer de colon metastásico.

25 Preferiblemente, los cánceres que pueden tratarse con los péptidos, las composiciones y los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a: cáncer de mama, carcinoide, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de tiroides y/o cáncer urotelial.

En una realización particular, el cáncer a tratar por los péptidos, composiciones y métodos de los descritos en el presente documento es cáncer de pulmón.

30 Los polipéptidos, composiciones y métodos de la divulgación también están destinados a prevenir o disminuir la metástasis de células tumorales.

35 Se incluye además dentro del alcance de la divulgación un método para tratar o prevenir una enfermedad en la que está implicada la angiogénesis, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la presente invención.

40 Las enfermedades relacionadas con la angiogénesis incluyen enfermedades neovasculares oculares (tales como, por ejemplo, retinopatía isquémica, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, oclusiones de venas retinianas, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular), aterosclerosis, artritis, psoriasis, obesidad y enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con la invención, los polipéptidos de la invención pueden administrarse por vía oral, tópica o por medios parenterales, incluyendo inyección subcutánea, transdérmica o intramuscular, implantación de depósitos de liberación sostenida, inyección intravenosa, administración intranasal y similares.

45 De acuerdo con la invención, las composiciones que comprenden los polipéptidos de la invención pueden ser soluciones acuosas, emulsiones, cremas, pomadas, suspensiones, geles, suspensiones liposomales y similares.

50 En otra realización de la invención, la composición que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención se puede usar en combinación con al menos otro ingrediente activo para tratar una enfermedad relacionada con la angiogénesis, tal como, por ejemplo, un agente antiangiogénico, citotóxico, quimioterapéutico o anticancerígeno, para proporcionar una actividad sinérgica. En un aspecto de la invención, los polipéptidos o la composición que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención pueden usarse como una terapia sinérgica complementaria para agentes antiangiogénicos, citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerígenos primarios para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis, y más específicamente para el tratamiento de cánceres y/o tumores.

55 Por "sinérgico", se entiende que el efecto total de la combinación de principios activos es mayor que el efecto de cada principio activo tomado por separado. Por "terapia sinérgica complementaria" se entiende una terapia combinada que utiliza agentes con mecanismos de acción complementarios que mejoran el efecto terapéutico de una monoterapia.

60 Los ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida (CTX; por ejemplo, CYTOXAN®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, LEUKERAN®), cisplatino (CisP; por ejemplo, PLATINOL®), oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN^{MR}), busulfano (por ejemplo, MYLERAN®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C y similares; antimetabolitos, tales como, por ejemplo, metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo, VEPESID®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo, XELODA®), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos, tales como, por ejemplo, actinomicina D, 65

doxorubicina (DXR; por ejemplo, ADRIAMYCIN®), daunorrubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como, por ejemplo, alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vincristina (VCR), vinblastina, y similares; y otros agentes antitumorales, tales como, por ejemplo, paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y derivados de paclitaxel, agentes citostáticos, glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo, DECADRON®) y corticosteroides como, por ejemplo, prednisona, inhibidores de enzimas nucleósidas tales como, por ejemplo, hidroxiurea, enzimas que agotan los aminoácidos tales como, por ejemplo, asparaginasa, leucovorina, ácido fólico, raltitrexed y otros derivados del ácido fólico, y agentes antitumorales similares y diversos. Los siguientes agentes también pueden usarse como agentes adicionales: amifostina (por ejemplo, ETHYOL®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo, DOXIL®), gemcitabina (por ejemplo, GEMZAR®), daunorrubicina lipo (por ejemplo, DAUNOXOME®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, TAXOTERE®), aldesleuquina, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, mitoxantrona, topotecano, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, o clorambucilo.

El uso de los agentes citotóxicos, quimioterapéuticos y otros agentes anticancerígenos descritos anteriormente en los regímenes quimioterapéuticos está generalmente bien caracterizado en las técnicas de terapia contra el cáncer, y su uso en el presente documento se enmarca en las mismas consideraciones para controlar la tolerancia y la eficacia y para controlar las rutas y dosis de administración, con algunos ajustes. Las dosis típicas de un agente citotóxico efectivo pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante, y cuando se indique mediante respuestas *in vitro* o respuestas en modelos animales, se pueden reducir hasta aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad. Por lo tanto, la dosificación real dependerá del juicio del médico, la condición del paciente y la efectividad del método terapéutico basado en la capacidad de respuesta *in vitro* de las células malignas cultivadas primarias o la muestra de tejido histocultivada, o las respuestas observadas en modelos animales apropiados.

En una realización particular, la divulgación relacionada con el método de tratamiento como se describió en el presente documento anteriormente comprende además administrar al menos un fármaco antineoplásico o antitumoral. En una realización particular, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento, una cantidad efectiva de:

- al menos un polipéptido como se describió en el presente documento anteriormente, preferiblemente P3 (SEQ ID NO: 1) o P4 (SEQ ID NO: 2); y
- un complejo de platino,

en el que preferiblemente dicha cantidad efectiva es suficiente para inhibir el crecimiento de cáncer o tumor. Dicho complejo de platino puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino, lipoplatino y combinación de los mismos.

El solicitante encontró sorprendentemente que la administración de un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 y un complejo de platino mostró un efecto sinérgico.

En una realización, dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran simultáneamente. En otra realización, dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran secuencialmente. Preferiblemente, dicho polipéptido y dicho complejo de platino se administran por rutas separadas.

En una realización particular del método de tratamiento de la invención, el sujeto a tratar se prueba o se probó previamente para detectar la presencia de células cancerosas que expresan CD9P-1.

Dicha identificación de células cancerosas que expresan CD9P-1 puede llevarse a cabo mediante cualquier método bien conocido en la técnica, tal como por ejemplo inmunohistoquímica, PCR, hibridación *in situ*, usando cebadores, secuencias o anticuerpos específicos para CD9P-1. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD9P-1 son los siguientes: SAB2700379, HPA017074 (Sigma).

Un objetivo de la divulgación es un kit de diagnóstico para seleccionar un sujeto que necesita el tratamiento de la invención. En una realización, dicho kit de diagnóstico comprende reactivos de inmunoensayo o cebadores o secuencias para medir la expresión de CD9P-1. CD9P-1 se utiliza como biomarcador para la prueba de diagnóstico complementaria.

Otro objetivo de la divulgación es un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende:

- evaluar la presencia de células cancerosas que expresan CD9P-1 en el sujeto;
- si se detectan células cancerosas que expresan CD9P-1, entonces se trata al sujeto como se describió en el presente documento anteriormente.

Otro objetivo de la divulgación es un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende:

- realizar una prueba de diagnóstico complementaria del sujeto antes del tratamiento, en la que dicha prueba de diagnóstico complementaria comprende detectar la presencia de células cancerosas que expresan CD9P-1;
- de acuerdo con un resultado positivo de la prueba de diagnóstico complementaria, tratar al sujeto como se describió en el presente documento anteriormente.

La divulgación también se refiere a un método para tratar un cáncer y/o tumor en un sujeto que lo necesita en el que las células cancerosas y/o las células tumorales expresan CD9P-1.

Esta invención se entenderá mejor a partir de los detalles experimentales que siguen. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos y resultados específicos discutidos son meramente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen a continuación, y no deben considerarse de ninguna manera como limitados a los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de HUVEC por los péptidos 3 y 4. La proliferación de células endoteliales humanas se expresa en porcentaje de proliferación de un control que consiste en HUVEC cultivados en presencia de disolvente; y se representa en función de la concentración de péptidos (en μM). Se comparan los resultados obtenidos para los péptidos PCT (control de péptidos), P3 y P4.

La Figura 2 es una fotografía que muestra la inhibición de los péptidos 3 y 4 sobre la formación de redes capilares por HUVEC cultivadas en una matriz extracelular Matrigel®. Las redes capilares se evidencian mediante marcación de fluorescencia con calceína, con un microscopio (zoom x40). Los resultados se muestran para concentraciones de péptidos de 6,5 μM , 13 μM y 33 μM . El disolvente se usa como control.

La Figura 3 es una fotografía que muestra la inhibición de la migración de HUVEC por P3. La migración de HUVEC sobre una herida generada con una punta de cincel se compara a $t = 0$ h y $t = 20$ h en presencia de disolvente (control), PCT (66 μM) o P3 (13 μM , 33 μM y 66 μM).

La Figura 4 es un histograma que muestra el nivel de hemoglobina medido en implantes de Matrigel®, enriquecidos en células tumorales y trasplantadas subcutáneamente en ratones Swiss nu/nu tratados durante 12 días con inyecciones intraperitoneales de péptidos P3, P4, P1 (a razón de 10 mg/kg) o por disolvente solo. **: $p < 0,01$.

La Figura 5 es un histograma que muestra los efectos de péptidos, disolvente y P3 *in vivo* sobre el crecimiento tumoral de las células NCI-H460 injertadas en ratones Swiss nu/nu. El volumen tumoral (en mm^3) se representa como una función del péptido probado. El disolvente se usa como control. **: $p < 0,01$.

La Figura 6 es un histograma que muestra la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral bajo el efecto de P3 y/o de cisplatino. El volumen tumoral (en mm^3) al final del tratamiento (13 días) se representa en función del tratamiento recibido. PCT: péptido de control; cis: cisplatino; n.s.: no significativo.

La Figura 7 es una fotografía de transferencias Western que muestra la expresión de CD9P-1 sobre lisados de células tumorales UMUC-3. Se cargaron cantidades crecientes de proteínas. Carril 1: 10 μg ; carril 2: 20 μg ; carril 3: 30 μg ; carril 4: 40 μg ; carril 5: 50 μg ; carril 6: 60 μg ; carril 7: 25 μg de lisado BT20 (control positivo). La transferencia Western de la línea A se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-CD9P-1. La transferencia Western de la línea B se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-actina.

La Figura 8 es un histograma que muestra los efectos del péptido P3 y cisplatino, administrados en combinación o solos, sobre el crecimiento tumoral *in vivo* de células UMUC-3. El histograma muestra la distribución del volumen tumoral (en mm^3) al final del tratamiento (13 días) en función del tratamiento recibido. El disolvente se usó como control. n.s.: no significativo; *: $p < 0,05$.

La Figura 9A es una fotografía que muestra la degradación de CD9 en HUVEC incubadas con GS-168AT2. Las columnas corresponden a los resultados de la transferencia Western obtenidos con el anticuerpo anti-CD9 después de 1 min, 15 min, 30 min, 1 hora o 3 horas de incubación.

La Figura 9B es un histograma que muestra la degradación de CD9 en HUVEC incubadas con GS-168AT2. Las bandas correspondientes a CD9 en la transferencia Western se cuantifican, se normalizan con respecto a GAPDH y se expresan en porcentaje con respecto a HUVEC incubadas con vehículo. La cantidad de CD9 se representa como una función del péptido probado.

La Figura 9C es una fotografía que muestra la degradación de CD151 en HUVEC incubadas con vehículo o GS-168AT2. Las líneas de arriba a abajo corresponden a los resultados de la transferencia Western obtenidos con el anticuerpo anti-CD151; con anticuerpo anti-CD81 y anticuerpo anti-GAPDH.

La Figura 9D es un histograma que muestra la degradación de CD151 en HUVEC incubadas con GS-168AT2. Las

bandas correspondientes a CD151 en la transferencia Western se cuantifican, normalizan con respecto a GAPDH y se expresan en porcentaje con respecto a HUVEC incubadas con vehículo. La cantidad de CD151 se representa como una función del péptido probado.

5 La Figura 9E es un histograma que muestra la degradación de CD81 en EC humanas incubadas con GS-168AT2. Las bandas correspondientes a CD81 en la transferencia Western se cuantifican, normalizan con respecto a GAPDH y se expresan en porcentaje con respecto a las HUVEC incubadas con vehículo. La cantidad de CD81 se representa como una función del péptido probado.

10 La Figura 10 es una fotografía que muestra los efectos *in vitro* del péptido P3 sobre la expresión de CD151, CD9, CD81, CD9P-1 y la cadena de integrina β 1 en HUVEC. Las líneas A a E corresponden respectivamente a los resultados de la transferencia Western obtenidos después de la incubación con P3 33 μ M hasta durante 5 horas de incubación, con un anticuerpo anti-CD151 (carril A); un anticuerpo anti-CD9 (carril B); un anticuerpo anti-CD81 (carril C); un anticuerpo anti-CD9P-1 (carril D); un anticuerpo anti-integrina β 1 (carril E) y un anticuerpo anti-GAPDH (carril F).

15 La Figura 11A es una fotografía que muestra la degradación de CD151 en presencia de P3 y P4 en implantes de Matrigel® enriquecidos en células NCI-H460. Las líneas 1 a 3 corresponden a los resultados de la transferencia Western obtenidos con el anticuerpo anti-CD151 (carril 1); con anticuerpo anti-CD9P-1 (carril 2) y anticuerpo anti-GAPDH (carril 3).

20 La Figura 11B es un histograma que muestra la degradación de CD151 en presencia de P3 y P4 en implantes de Matrigel® enriquecidos en células NCI-H460. CD151, correspondiente a la banda de 28KDa en la transferencia Western, se cuantifica, normaliza con respecto a GAPDH y se expresa en porcentaje con respecto al disolvente. La cantidad de CD151 se representa como una función del péptido probado.

25 La Figura 12A es una fotografía que muestra la degradación de CD151 en xenoinjertos de células NCI-H460 cuando los ratones desnudo suizo/desnudo se tratan con los péptidos 3 y 4. Las líneas 1 a 3 corresponden a los resultados de la transferencia Western obtenidos con el anticuerpo anti-CD151 (carril 1); con anticuerpo anti-CD9P-1 (carril 2) y anticuerpo anti-GAPDH (carril 3).

30 La Figura 12B es un histograma que muestra la degradación de CD151 en xenoinjertos de células NCI-H460 cuando los ratones desnudo suizo/desnudo se tratan con los péptidos 3 y 4. Las bandas correspondientes a CD151 en la transferencia Western se cuantifican, normalizan con respecto a GAPDH y se expresan en porcentaje con respecto a los xenoinjertos de ratones tratados con el disolvente solo. La cantidad de CD151 se representa como una función del péptido probado.

35 La Figura 13 es una fotografía que representa la disociación de los complejos CD9-CD9P-1, CD9P-1-CD151 y CD9-CD151 por P3 en HUVEC. Las HUVEC incubadas durante 2 horas con P3 33 μ M, PCT o disolvente en medio EGM2-MV se lisaron en regulador brij 97, luego se inmunoprecipitaron CD81, CD9 o CD151 con el anticuerpo correspondiente. Línea A: resultados de transferencia Western obtenidos con anticuerpo anti-CD9P-1 de CD81, CD9 y CD151 inmunoprecipitados. Línea B: resultados de la transferencia Western obtenidos con anticuerpo anti-CD9 de CD81, CD9 y CD151 inmunoprecipitados. Línea C: resultados de la transferencia Western obtenidos con anticuerpo anti-CD151 de CD81, CD9 y CD151 inmunoprecipitados. PCT: péptido de control. IP: inmunoprecipitación.

45 La Figura 14A es un histograma que muestra el aumento de la producción de endostatina en los sobrenadantes de HUVEC incubadas con P3 *in vivo*. La concentración de endostatina en los sobrenadantes, cuantificada por ELISA (expresada en ng/mg de proteínas en el lisado celular) se representa en función de la concentración de P3. **: p <0,01 (ensayo de Student no paramétrico contra el disolvente).

50 La Figura 14B es una fotografía que muestra el aumento de la producción de endostatina en los sobrenadantes de HUVEC incubadas con P3 *in vivo*. Los resultados de la transferencia Western se obtuvieron después de la inmunoprecipitación de endostatina en un mismo volumen de sobrenadante por el anticuerpo policlonal anti-COL18A1.

55 La Figura 15A es un histograma que muestra el aumento inducido por P3 de endostatina circulante *in vivo*. El histograma muestra la concentración de endostatina en el sobrenadante (en ng/mg de proteínas) en función del péptido probado. La concentración de endostatina se midió por ELISA en sueros obtenidos en el estudio *in vivo*.

60 La Figura 15B es una fotografía que muestra el aumento inducido por P3 de endostatina circulante *in vivo*. La imagen se obtuvo mediante la transferencia Western de sueros obtenidos en el estudio *in vivo* con el anticuerpo anti-COL18A1.

65 La Figura 16 es un histograma que muestra la inhibición de la producción de endostatina inducida por P3 y/o por GM6001 en HUVEC *in vitro*. La concentración de endostatina en el sobrenadante (en ng/mg de proteínas) se representa como una función del tratamiento proporcionado a las células. La concentración de endostatina en los sobrenadantes se midió por ELISA (ensayo de Student no paramétrico contra el disolvente).

La Figura 17 es un histograma que muestra la producción *in vivo* de endostatina en sobrenadantes de HUVEC en

presencia de un anticuerpo anti-CD151. La concentración de endostatina en el sobrenadante (en ng/mg de proteínas) se representa como una función del tratamiento proporcionado a las células. La concentración de endostatina en los sobrenadantes se midió por ELISA (ensayo de Student no paramétrico contra el disolvente).

5 La Figura 18A es una fotografía que muestra que el aumento de la producción de endostatina está relacionado con el agotamiento de CD151 en HUVEC. Las imágenes corresponden a los resultados de la transferencia Western obtenidos con lisados de HUVEC después del tratamiento con varios ARNpi (ARNpi FITC, ARNpi CD151 o ARNpi CD9).

10 La Figura 18B es un histograma que muestra que el aumento de la producción de endostatina está relacionado con el agotamiento de CD151 en HUVEC. La concentración de endostatina en el sobrenadante (en ng/mg de proteínas) se representa como una función del tratamiento proporcionado a las células. La concentración de endostatina en los sobrenadantes se midió por ELISA en sobrenadantes de HUVEC incubados con ARNpi durante 48 horas.

15 La Figura 19 es un histograma que muestra los efectos del péptido PEGilado P4 y cisplatino, administrado en combinación o solo, sobre el crecimiento tumoral *in vivo* de las células Calu-6. El histograma muestra la distribución del volumen tumoral (en mm³) al final del tratamiento (16 días) en función del tratamiento recibido. El disolvente se usó como control.

20 Ejemplos

Material y métodos

Cultivo de células

25 Las células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC) se cultivaron en un medio EGM2-MV (medio EBM2 que contenía 5% de SVF; 0,4% de FGF-2 humano; 0,1% de VEGF; 0,1% de IGF-1 con sustitución de arginina por glutamina en la posición 3 (R3-IGF-1); 0,1% de EGF humano; 0,04% de hidrocortisona; 0,1% de ácido ascórbico, 0,1% de gentamicina-100.

30 Las células NCI-H460 (células cancerosas humanas de pulmón de células no pequeñas) se cultivaron en medio RPMI1640 suplementado con 2,5 g/L de glucosa; HEPES 10 mM; piruvato de sodio 1 mM; 10% de SVF.

35 Se cultivaron células UMUC-3 (células de cáncer de vejiga humana) en un medio MEM NEAA suplementado con 10% de SVF; piruvato de sodio 1 mM; y glutamina 2 mM.

Método para seleccionar los péptidos

40 Los péptidos se sintetizaron mediante GENECUST y se solubilizaron en DMSO al 10% a razón de 10 mg/mL para pruebas *in vitro* y 1 mg/mL para pruebas *in vivo*. El péptido de control (PCT) (SEQ ID NO: 5: NQKGCYDLVT; peso molecular 1140 Da) se usó a la misma concentración final que los péptidos probados.

Prueba de proliferación celular

45 La evaluación de la proliferación celular se realizó usando el ensayo de bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Después de 18 horas de cultivo, el medio se cambió por EBM2 suplementado con gentamicina y 5% de SVF. Se añadieron diferentes concentraciones de péptidos bajo un volumen de 10 µL/pozo. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Se añadió MTT (50 µL/pozo) a las células durante 3 horas.

50 Evaluación de la formación de capilares.

55 La evaluación de la formación de capilares en Matrigel® se realizó mediante la prueba de angiogénesis *in vitro* descrita en Grant et al., (1989 Cell 58, 933-943). Matrigel® se dejó caer en los pozos de las placas de 96 pozos y se mantuvo durante 30 minutos a 37 °C para la solidificación de Matrigel®. Luego se sembraron células HUVEC y se añadieron 5 µL de péptido.

Las placas se incubaron luego durante 18 horas a 37 °C, las células se lavaron con solución de calceína (50 µL/pozo a 8 µM) y se incubaron durante 20 minutos. Las HUVEC vivas metabolizan la calceína en un componente fluorescente verde.

60 Prueba de migración después de la prueba de la lesión.

65 La migración de las células se evaluó de acuerdo con la prueba de la lesión (Sato y Rifkin 1988 J Cell Biol 107, 1199-1205). Las HUVEC se cultivaron hasta confluencia en un medio EGM2-MV. El ancho de la lesión se midió utilizando el software "Analysis" (Soft Imaging System GmbH Digital, Olympus). Los péptidos a analizar se agregaron luego al medio.

Prueba de angiogénesis *in vivo*

5 Los implantes de Matrigel® representan un modelo *in vivo* de angiogénesis. Las células NCI-H460 se usan para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para la formación de vasos sanguíneos dentro de la matriz Matrigel®. La mezcla se inyectó por vía subcutánea en los ratones Swiss nu/nu. Los tratamientos diarios con los péptidos (1 mg/mL) se realizaron mediante inyecciones intraperitoneales. Los implantes se recogieron después de 12 días.

10 Cuantificación de los niveles de hemoglobina en implantes de Matrigel®

La dosis de hemoglobina en implantes se usó como un indicador de los vasos del implante. Los implantes fueron pesados y triturados.

15 Prueba de crecimiento tumoral *in vivo*

20 Se anestesiaron ratones hembra suizos nu/nu de 5 a 6 semanas de edad con xilazina (12 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg). Las células tumorales (NCI-H460 o UMUC-3) se implantaron por vía subcutánea en los flancos de los ratones. Cuando el tumor alcanza 100 mm³ después de 10 días de inoculación, los animales se asignan al azar y se tratan mediante inyección cada dos días con péptidos, cisplatino por vía intraperitoneal durante 13 días. Se midieron los tamaños de los tumores y se calculó el volumen del tumor. Los ratones fueron pesados para detectar síntomas de dolor.

25 Supresión de la expresión de tetraspaninas

Las HUVEC se transfectaron con ARNpi usando el agente de transfección GENJET de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes, se analizó la expresión de proteínas mediante transferencias Western y se cuantificó la endostatina.

Cebadores sc-42829 A, B y C agrupados humanos de ACD151 (Santa Cruz Inc)	secuencia	SEQ ID NO
Sentido A	CGAGAAGAAGACAACAUGUtt	SEQ ID NO: 6
Antisentido A	ACAUGUUGUCUUCUUCUCGtt	SEQ ID NO: 7
Sentido B	CCUCCAACAUCUACAAGGUtt	SEQ ID NO: 8
Antisentido B	ACCUUGUAGAUGUUGGAGtt	SEQ ID NO: 9
Sentido C	CAGGUCUUUGGCAUGAUCUtt	SEQ ID NO: 10
Antisentido C	AGAUCAUGCCAAAGACCUGtt	SEQ ID NO: 11

30

Cebadores sc-35032 A, B y C agrupados humanos de CD9 (Santa Cruz Inc)	secuencia	SEQ ID NO
Sentido A	CCAUCCACUAUGCGUUGAAtt	SEQ ID NO: 12
Antisentido A	UUCAACGCAUAGUGGAUGtt	SEQ ID NO: 13
Sentido B	CUGUCCUGAUGCCAUCAAAAtt	SEQ ID NO: 14
Antisentido B	UUUGAUGGCAUCAGGACAGtt	SEQ ID NO: 15
Sentido C	GGCAUGAUCUUCAGUAUGAtt	SEQ ID NO: 16
Antisentido C	UCAUACUGAAGAUCAUGCCtt	SEQ ID NO: 17

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

35 Ejemplo 1: inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de HUVEC por P3 y P4

Las células se cultivaron durante 48 horas en EGM2-MV y la proliferación se cuantificó por ensayo MTT. Los resultados se muestran en la Figura 1 y se expresan como un porcentaje de proliferación celular con respecto a las HUVEC cultivadas en presencia de disolvente.

El efecto de 3 péptidos se probó en la proliferación de HUVEC. No se observó ningún efecto con P1 (SEQ ID NO: 4: VSWFAVHSFGLDKAPVLLSS) sobre la proliferación (resultados no mostrados), como para el PCT (SEQ ID NO: 5: NQKGCYDLVT).

- 5 Por el contrario, el péptido 3 (P3 - SEQ ID NO: 1) inhibe la proliferación de HUVEC de una forma dependiente de la dosis (Figura 1). A 66 μM , 50% \pm 1,2% ($p < 0,001$; $n = 3$) de la proliferación de las HUVEC es inhibida por P3. A 264 μM , la proliferación en condiciones P3 es del 27,3% \pm 0,3% ($p < 0,001$ relacionado con PCT; $n = 3$). Las pruebas realizadas con el péptido 4 (P4 - SEQ ID NO: 2) mostraron una inhibición del 20% en la proliferación de HUVEC hasta 66 μM de concentración (Figura 1). A una concentración de 132 μM , P4 aumenta la inhibición de la proliferación de HUVEC de 26% \pm 1.75% ($p = 0,0121$ relacionado con PCT; $n = 3$).

Ejemplo 2: inhibición de P3 y P4 de la formación de redes capilares por HUVEC cultivadas en Matrigel®

- 15 Se añadieron péptidos al medio de cultivo (EGM2-MV) a concentraciones de 6,5 μM , 13 μM y 33 μM después de la inoculación de las células. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. La marcación de fluorescencia se logró mediante la adición de calceína. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara (zoom x40). Los resultados se muestran en la Figura 2.

- 20 La formación de estructuras de red observadas es espontánea en presencia de disolvente. La adición de PCT no tiene ningún efecto sobre la formación de tubos capilares por HUVEC (Figura 2). Por el contrario, P3 aumenta las disminuciones dependientes de la dosis tanto de la longitud de los capilares como del número de uniones, lo que ilustra una actividad antiangiogénica *in vitro* significativa (Figura 2). P4 también demuestra una disminución significativa tanto de la longitud de los capilares como del número de uniones, lo que ilustra una actividad antiangiogénica *in vitro* significativa.

- 25 Ejemplo 3: inhibición de la migración dependiente de P3 de HUVEC

- 30 Se realizó una herida con una punta de cincel en la capa celular. La migración de HUVEC después de la adición de péptidos se evaluó mediante el ensayo de la herida y el progreso del frente de migración de las HUVEC se analizó después de 20 horas de cultivo. Los resultados muestran que las heridas a las que se añadió el disolvente o el PCT están completamente cerradas después de 20 horas de incubación. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio equipado con una cámara (zoom x40). En las células incubadas con 13 μM de P3, se observa una inhibición parcial de la cicatriz. A 33 μM , P3 parece evitar por completo la migración de HUVEC y el progreso del frente de migración se inhibe significativamente o casi se detiene (Figura 3).

- 35 Ejemplo 4: efecto de P3 y P4 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*

- 40 Un modelo *in vivo* de angiogénesis como se describe en Passaniti et al., (1992 Experimental gerontology 27, 559-566) se utilizó para evaluar el efecto de P3 y P4. En resumen, las células cancerosas se incorporaron en Matrigel®, las células cancerosas proporcionan los factores de crecimiento y angiogénico necesarios para la formación de vasos sanguíneos. La mezcla se inyectó inmediatamente bajo una forma subcutánea de los flancos de los ratones. El día después de la inoculación, 20 ratones (Swiss nu-nu) fueron asignados al azar en 4 grupos que contenían 5 ratones cada uno y los tratamientos comenzaron de la siguiente manera: los ratones del grupo 1 fueron tratados con 200 μL /inyección/día de disolvente solo durante 12 días sucesivos; los ratones del grupo 2 fueron tratados con 200 μL /inyección de una solución P1 (1 mg/mL) en un disolvente/inyección/día durante 12 días sucesivos; los ratones del grupo 3 se trataron con 200 μL de una solución P3 (1 mg/mL) en un disolvente/inyección/día durante 12 días sucesivos; Los ratones del grupo 4 se trataron con 200 μL de una solución P4 (1 mg/mL) en un disolvente/inyección/día durante 12 días sucesivos.

- 50 Se sacrificaron los ratones el día 13 y se recogieron y examinaron los implantes. Los resultados muestran que los implantes del grupo 1 (ratones de control que tienen el disolvente solo) y el grupo 2 (ratones que tienen 10 mg/kg de P1) se caracterizan por un color rojo, mientras que los implantes recogidos del grupo 3 (ratones que tienen 10 mg/kg de P3) y el grupo 4 (ratones que tienen 10 mg/kg de P4) se caracterizan por un color amarillo con algunos puntos rojos, lo que sugiere una inhibición de la angiogénesis *in vivo*. La dosis de hemoglobina en los implantes se utilizó para cuantificar la sangre y, por lo tanto, evaluar la densidad de los vasos funcionales dentro de los implantes. El análisis de los implantes tratados con P3 y P4 muestra que estos péptidos inducen una inhibición de la cantidad de hemoglobina de 67,2 \pm 6,5% ($p = 0,0012$) y 29,2 \pm 8,4% ($p = 0,0029$) en comparación con el grupo 1 (Figura 4). Estos resultados demuestran que P3 y P4 presentan propiedades antiangiogénicas.

- 60 Ejemplo 5: Efecto de P3 sobre el crecimiento tumoral - modelo NCI-H460

- 65 Se realizó la evaluación del efecto de los péptidos sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Las células cancerosas NCI-H460 se inyectaron por administración subcutánea en los flancos de ratones Swiss-nu/nu ($n = 20$). 10 días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones fueron asignados al azar en 2 grupos de 5 ratones. Los ratones de diferentes grupos se trataron como sigue: los ratones del grupo 1 se trataron con disolvente (200 μL /inyección/48 horas); los ratones del grupo 2 se trataron con P3 (200 μL de 1 mg/mL de P3 en el disolvente/inyección/48 horas).

Todos los tratamientos se realizaron mediante inyección intraperitoneal durante 13 días sucesivos.

Después de 13 días de tratamiento, los resultados muestran que el promedio del volumen tumoral de los tumores tratados con el disolvente es $1560 \pm 188,3 \text{ mm}^3$ ($n = 5$) ($p = 0,2625$; $n = 5$) (Figura 5). Por el contrario, el promedio del volumen tumoral de los ratones tratados con P3 es $651,5 \pm 80,97 \text{ mm}^3$ ($p = 0,005$; $n = 5$) (Figura 5), lo que indica una inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* de $64,79 \pm 4,37\%$ ($p < 0,05$).

Paralelamente, para investigar el efecto tóxico de los péptidos probados en ratones, se midieron los pesos de los ratones a lo largo del tratamiento. No se notaron cambios significativos de los pesos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Pesos promedio de ratones al comienzo del tratamiento (día 0) y al final (día 13), y % de diferencias de peso de los ratones durante el tratamiento con Solvente y P3.

Tratamiento	Pesos promedio de ratones al comienzo del tratamiento (g)	Pesos promedio de ratones después de 13 días del tratamiento (g)	Diferencia en peso entre el día 1 y el día 13 (%)
Disolvente	$22,9 \pm 0,3 \%$	$24,8 \pm 0,7 \%$	$7,7 \pm 3\%$
P3	$22,1 \pm 2,3\%$	$24,6 \pm 0,4\%$	$10,2 \pm 9\%$

Ejemplo 6: efecto combinado de P3 y efecto de cisplatino sobre el crecimiento tumoral

Para comparar la actividad biológica de P3 con GS-168AT2, se realizó un estudio sobre la actividad antitumoral de P3 solo o en combinación con cisplatino *in vivo*.

La inoculación de células NCI-H460 (volumen tumoral de 100 a 150 mm^3), ratones ($n = 35$) se asignaron al azar en 7 grupos que comprendían 5 ratones cada uno. Los ratones de los diferentes grupos se trataron como sigue: grupo 1 con el disolvente (200 μL /inyección/48 horas); los ratones del grupo 2 fueron tratados con cisplatino (5 mg/kg). Los ratones del grupo 3 fueron tratados con P3 (10 mg/kg); los ratones del grupo 4 fueron tratados alternativamente con P3 (10 mg/kg) y cisplatino (5 mg/kg), los ratones del grupo 5 fueron tratados con cisplatino (2,5 mg/kg); los ratones del grupo 6 fueron tratados alternativamente con P3 (10 mg/kg) y cisplatino (2,5 mg/kg); los ratones del grupo 7 fueron tratados alternativamente con P3 (10 mg/kg) y cisplatino (1 mg/kg). Todos los tratamientos se realizaron mediante inyección intraperitoneal durante 13 días sucesivos.

Los resultados indican que la monoterapia con P3 (10 mg/kg) muestra una eficacia terapéutica cercana o similar a la del cisplatino (5 mg/kg). El volumen tumoral promedio del grupo tratado con P3 es aproximadamente $651,5 \pm 80,9 \text{ mm}^3$ ($p = 0,0013$; $n = 5$) mientras que el volumen tumoral promedio del grupo control es $1698 \pm 164,9 \text{ mm}^3$ ($n = 5$), lo que indica que el tratamiento con P3 solo induce la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* de $61,61 \pm 4,74\%$ ($p < 0,05$; $n = 5$) (Figura 6). El volumen tumoral promedio de los ratones tratados con cisplatino solo (5 mg/kg) es de $626 \pm 118,5 \text{ mm}^3$ ($p = 0,0019$; $n = 5$), lo que indica que este tratamiento induce la inhibición del crecimiento tumoral similar al efecto de P3 (Figura 6). El efecto de la biterapia, alternados diariamente, con cisplatino (5 mg/kg) y P3 (10 mg/kg) muestra que el volumen tumoral promedio del grupo tratado con esta biterapia es $551,9 \pm 122,4 \text{ mm}^3$ ($p = 0,0012$; $n = 5$). En consecuencia, esta biterapia inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en $69,85 \pm 7,2\%$ ($p < 0,05$; $n = 5$).

Disminución de las dosis de cisplatino (2,5 luego 1 mg/kg) administradas en monoterapia o biterapia alternada diariamente con P3 (10 mg/kg). El objetivo es mantener la eficacia terapéutica mientras se limitan los posibles efectos sistémicos observados con cisplatino a una dosis de 5 mg/kg o eventuales mecanismos de resistencia dependiendo de las dosis de los agentes quimioterapéuticos. La reducción de la mitad de la dosis de cisplatino (2,5 mg/kg) aumenta la disminución de la eficacia antitumoral (el volumen tumoral promedio es $1017 \pm 119,8 \text{ mm}^3$; $p = 0,011$; $n = 5$). Sin embargo, los tratamientos por biterapia que se alternan diariamente con cisplatino (2,5 mg/kg) y P3 (10 mg/kg) o cisplatino (1 mg/kg) y P3 (10 mg/kg) mantienen la eficacia terapéutica con promedios de volumen tumoral respectivamente de $318,7 \pm 103,3 \text{ mm}^3$; ($p = 0,0004$; $n = 5$) y de $265,4 \pm 72,1 \text{ mm}^3$ ($p = 0,0002$; $n = 5$) (Figura 6).

Además, los ratones tratados con cisplatino (5 mg/kg) exhiben una pérdida de peso significativa de $20 \pm 7\%$; $p = 0,0159$ en comparación con el control; $n = 5$) o alternativamente con P3 (10 mg/kg) de $18 \pm 11\%$; ($p = 0,079$ comparado con el control; $n = 5$). La disminución de la dosis de cisplatino a la mitad (2,5 mg/kg) reduce la pérdida de peso al $6 \pm 3\%$. Los cambios en el peso de los ratones tratados en forma alterna con cisplatino (2,5 mg/kg) y P3 (10 mg/kg) es de $-7 \pm 1\%$. La reducción de la dosis de cisplatino (1 mg/kg) no mejora los cambios de peso como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2: Pesos promedio de los ratones al comienzo del tratamiento (día 0) y al final (día 13), y el % de las diferencias de peso de los ratones durante el tratamiento con P3 y/o cisplatino.

Tratamiento	Pesos promedio de ratones al comienzo del tratamiento (g)	Pesos promedio de ratones después de 13 días del tratamiento (g)	Diferencia en peso entre el día 1 y el día 13 (%)
Disolvente	$23,6 \pm 1,2 \%$	$24,9 \pm 1,3 \%$	$5 \pm 2\%$
5 mg/kg de cis	$24,6 \pm 1,6 \%$	$20,5 \pm 1,2 \%$	$-20 \pm 7\%$
P3	$24,6 \pm 2,8 \%$	$26,2 \pm 2,9 \%$	$6 \pm 2\%$
5 mg/kg de cis + P3	$23,7 \pm 2,3 \%$	$20,2 \pm 2,6 \%$	$-18 \pm 11\%$

2,5 mg/kg de cis	24,8 ± 1,2 %	23,5 ± 0,7 %	-6 ± 3%
2,5 mg/kg de cis + P3	25,5 ± 0,7 %	23,8 ± 0,9 %	-7 ± 1%
1 mg/kg de cis + P3	24,5 ± 0,9 %	25,9 ± 0,9 %	5 ± 6%

Ejemplo 7: Efecto de P3 sobre el crecimiento tumoral - Modelo UMUC – que demuestra la dependencia de CD9P-1

5 P3 se deriva de CD9P-1. Para verificar si P3 interactúa con CD9P-1, P3 se probó en una línea celular tumoral que no expresa CD9P-1. La línea celular UMUC-3 (una línea celular de tumor de vejiga) se identificó en un ensayo de detección como una línea celular que no expresa CD9P-1. Cantidades crecientes de lisados de UMUC-3 (10 a 60 µg) analizados por transferencias Western muestran que estas células no expresan CD9P-1 (Figura 7A).

10 El efecto de P3 se probó luego sobre el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de UMUC-3. Las células UMUC-3 se inocularon durante 10 días (volumen tumoral de 100 a 150 mm³, los ratones (n = 20) se asignaron al azar en 4 grupos que contenían 5 ratones cada uno. Los diferentes grupos se trataron de la siguiente manera: los ratones del grupo 1 fueron tratados con el disolvente (200 µL/inyección/48 horas); los ratones del grupo 2 fueron tratados con cisplatino (2,5 mg/kg); los ratones del grupo 3 fueron tratados con P3 (10 mg/kg); los ratones del grupo 4 fueron tratados en forma alterna con cisplatino (2,5 mg/kg) y P3 (10 mg/kg). El volumen tumoral de los ratones tratados con P3 no cambió significativamente en comparación con el volumen tumoral de los ratones tratados con el disolvente (Figura 8) lo que indica que P3 no afecta el crecimiento tumoral de tumores que no expresan CD9P-1. Sin embargo, estos tumores se reducen con el tratamiento con cisplatino (2,5 mg/kg) (Figura 8).

Ejemplo 8: Efecto de P3 sobre tetraspaninas

20 El estado de la técnica ya demostró que GS-168AT2 está asociado a CD9, CD151 y más débilmente a CD81. El estado de CD9, CD151 y CD81 se evaluó con el tiempo en presencia de GS-168AT2 (Colin et al., 2011 Br J Cancer 105,1002-1011). Las HUVEC se incubaron con GS-168AT2 (40 µg/mL), luego se lisaron, y los lisados celulares se sometieron a transferencia Western con anticuerpos anti-CD9, anti-CD151 y anti-CD81. Los resultados indicaron que GS-168AT2 induce la degradación de CD9 y CD151 después de 1 hora de tratamiento (Figura 9A y C). Para investigar más a fondo, las HUVEC incubadas con GS-168AT2 también fueron analizadas por FACS. Los resultados muestran disminuciones importantes en las cantidades de CD9 y CD151 en la superficie celular con el tiempo en presencia de GS-168AT2 en relación con el control, respectivamente aproximadamente 40% menos (P < 0,05; Figura 9B) y aproximadamente 70% menos (P < 0,01; Figura 9D). Sin embargo, no se observaron cambios significativos del estado de CD81 después de la exposición de las células a GS-168AT2 (Figura 9C y E). La degradación de CD9 y CD151 disminuye las interacciones entre CD9 y CD181, CD9 y CD151 y CD81 y CD9P-1. Luego se estudiaron mecanismos similares con P3 en diferentes modelos celulares *in vitro* e *in vivo*.

35 El efecto *in vitro* de P3 sobre las tetraspaninas (CD9, CD81 y CD151) y la integrina β1 se realizó en células endoteliales. Las HUVEC se incubaron con P3 (33 µM) en diferentes puntos de tiempo. P3 induce una disminución significativa de CD151 de 2 horas de incubación (Figura 10A). Sin embargo, ni la expresión de CD9 (Figura 10B), CD81 (Figura 10C) y CD9P-1 (Figura 10D) ni la integrina β1 están afectadas por P3.

40 El análisis de la expresión de CD151 y CD9P-1 se realizó en transferencias Western en homogeneizados de implantes de Matrigel® enriquecidos con NCI-H460. El perfil de CD151 se caracteriza por 2 bandas en las transferencias Western; una a 28 kDa corresponde a CD151 y la otra a 26 kDa correspondiente a un producto degradado de CD151. Los resultados muestran una disminución significativa de CD151 en los lisados de ratones tratados con P3 y P4 (10 mg/kg) durante 12 días (Figura 11A-1). Sin embargo, el nivel de CD9P-1 no cambia (Figura 11A-2). La cuantificación de la banda correspondiente a CD151 (Figura 11B) muestra una disminución del 57 y 51% de la banda correspondiente a CD151 en lisados de ratones tratados con P3 y P4.

50 En lisados de xenoinjertos de células NCI-H460 de ratones tratados durante 13 días cada dos días por P3 o P4 (10 mg/kg), se observa una disminución del nivel de CD151 respectivamente del 73% y 50% en comparación con los ratones tratados con el disolvente (Figura 12A y B). No se observó ningún cambio en CD9P-1 (Figura 12A).

55 Para estudiar con mayor precisión el efecto de P3 en las asociaciones de tetraspaninas CD9, CD81 y CD151 entre ellas y con CD9P-1, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación (IP). En el experimento de control (con el disolvente), CD9P-1 precipitó conjuntamente con CD9 y CD81. Se observó una precipitación conjunta débil entre P3 y CD151. Las asociaciones entre tetraspaninas y CD9P-1 no se modifican bajo la condición del PCT. Sin embargo, las interacciones entre CD9P-1 y CD9 y entre CD9P-1 y CD151 disminuyen mientras que las HUVEC se incuban durante 2 horas con 33 µM de P3. La asociación entre CD9P-1 y CD81 no se modifica por P3 (Figura 13A).

60 En el experimento de control (con el disolvente), las asociaciones entre CD9 y CD151 y entre CD9 y CD81 son similares. La adición de P3 induce una disminución en la asociación entre CD9 y CD151 pero no entre CD9 y CD81 (Figura 13B). La adición de P3 induce la disociación del complejo CD151-CD9 pero no del complejo CD151-CD81 (Figura 13C).

Ejemplo 9: Efecto de P3 sobre la producción de endostatina en un modelo *in vitro* e *in vivo*

La endostatina es un fragmento de colágeno XVIII (O'Reilly et al., 1997 Cell 88, 277-285) y un reconocido inhibidor de la angiogénesis. Además, GS-168AT2 induce la producción de endostatina *in vivo* e *in vitro*, por lo que se hace la pregunta relacionada con la capacidad de P3 derivada de GS-168AT2 para afectar esta actividad.

Los niveles de endostatina se cuantificaron mediante ELISA en lisados de HUVEC incubadas a concentraciones crecientes de P3 o PCT durante 48 horas. Si bien PCT no modifica el nivel de endostatina en comparación con la condición del disolvente, se observa un aumento de la producción de endostatina de 33 y 62% bajo 33 y 66 μ M de P3 respectivamente (Figura 14A).

Al emitirse endostatina a partir del colágeno XVIII, el anticuerpo podría detectar tanto la endostatina como el colágeno XVIII. Luego se realizó una IP para confirmar que la dosificación por ELISA se debió a endostatina (Figura 14B).

Para estudiar el efecto de P3 sobre la producción de endostatina *in vivo*, se analizaron sueros de ratones de xenoinjerto con células tumorales NCI-H460 por ELISA y transferencias Western. Se observa un aumento del 24% en sueros de ratones tratados con P3 (10 mg/kg) en comparación con los ratones tratados con el disolvente (Figura 15A). Se observan varias formas de endostatina mediante transferencias Western. El análisis de sueros mediante transferencias Western confirma el aumento de los niveles de endostatina en los sueros de ratones tratados con P3 y que tienen un tamaño de aproximadamente 28 kDa (Figura 15B).

Para evaluar el papel de las metaloproteinasas (MMP) en la producción de endostatina, se usó un inhibidor polivalente de MMP, GM6001. La concentración de endostatina en los sobrenadantes es de 6,2 ng/mg de proteína de los lisados / 48 horas. Se observó una disminución significativa de aproximadamente el 30% (4,4 ng/mg de proteína de los lisados / 48 horas) de endostatina con el inhibidor de MMP en comparación con el control. Se observó un aumento del 10% (6,85 ng/mg de proteína de los lisados/48 horas) del nivel de endostatina con 33 μ M de P3 y del 46% (8,48 ng/mg de proteína de los lisados/48 horas) con 66 μ M de P3. Al agregar un inhibidor de MMP 45 minutos antes de la adición de P3, se observó una disminución significativa en los niveles de endostatina del 30% en comparación con el control (Figura 16). GM6001 inhibe la producción de endostatina inducida por P3. Las MMP podrían estar implicadas en la producción de endostatina inducida por P3.

Los resultados anteriores mostraron que P3 indujo una disminución de CD151 *in vitro* e *in vivo* y un aumento de endostatina *in vitro* e *in vivo*. Esto planteó la cuestión sobre el vínculo entre la producción de endostatina y la disminución de CD151. Por lo tanto, CD151 se agotó y los niveles de endostatina se determinaron en sobrenadantes. Para hacerlo, se suprimió la expresión de CD151 usando anticuerpo anti-CD151 y pequeños ARN interferentes (ARNpi) dirigidos específicamente contra el ARNm que codifica CD151.

Se incubaron HUVEC durante 48 horas en un medio EGM2-MV con un anticuerpo anti-CD151 (11G5a) o un anticuerpo irrelevante (control negativo incapaz de reconocer ninguna proteína). Luego, los niveles de endostatina se midieron por ELISA en sobrenadantes. Se observó un aumento del 33% cuando las HUVEC se incubaron con el anticuerpo anti-CD151 (11G5a) en comparación con la producción basal de endostatina donde las células HUVEC se cultivan solas (Figura 17).

Las células HUVEC se transfectaron con ARNpi específico de CD151 y CD9. La expresión de proteínas se analizó en transferencias Western. Paralelamente, los niveles de endostatina se midieron por ELISA en sobrenadantes. Las HUVEC transfectadas con ARNpi específicas de CD151 y CD9 suprimieron su expresión respectiva (Figura 18A). Se midieron los niveles de endostatina en el sobrenadante de las células HUVEC transfectadas con ARNpi. No se observaron cambios entre el control y la supresión de la expresión de CD9 (1,26 ng/mg de lisados de proteínas/48 horas y 2 ng/mg de lisados de proteínas/48 horas respectivamente). Por el contrario, los niveles de endostatina aumentaron a 9,4 ng/mg de lisados de proteínas/48 horas en HUVEC agotadas en CD151 (Figura 18B). Por lo tanto, CD151 participa en la producción de endostatina.

Ejemplo 10: efecto del péptido 4 pegilado sobre el volumen tumoral

Todos los experimentos fueron revisados por el comité institucional de cuidado y uso de animales de Genopole, y se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales para el cuidado de animales. Se usaron ratones hembra BALB/c nu/nu (n = 24) a las 5-6 semanas de edad. Los animales se alojaron en cabinas de flujo de aire laminar en condiciones libres de patógenos con un horario de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad, y se alimentaron con comida estándar autoclavada y agua a voluntad. Se inyectaron subcutáneamente células Calu-6 (5×10^6 células en 200 μ L de RPMI sin suero) en el flanco derecho de los ratones. Después del injerto (10 días), se midió el volumen del tumor (TV) (Balsari et al., Eur J Cancer. Mayo de 2004; 40 (8): 1275-81) y los animales se asignaron al azar y se separaron en cuatro grupos de seis animales cada uno, para ser tratado por inyección ip (200 μ L por inyección) cada dos días durante 16 días (ocho inyecciones). Los ratones de control (grupo 1) recibieron el vehículo (solución salina al 0,9%). El dicloruro de cis-diamina platino II (CDDP; Sigma) se disolvió en solución salina al 0,9% a razón de 0,5 mg/mL y se inyectó a una dosis de 5 mg/kg (grupo 2). El péptido 4 pegilado (P4-PEG) se disolvió en el vehículo a razón de 1 mg/mL y se inyectó a una dosis de 10 mg/kg (grupo 3). En el grupo 4, los ratones recibieron tanto CDDP como P4-

PEG. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron cada dos días durante el período de tratamiento (16 días).

Se observa una disminución significativa en el volumen del tumor en ratones tratados con CDDP solo, P4-PEG solo y ambos CDDP y P4-PEG. En consecuencia, P4-PEG tiene un efecto antitumoral significativo.

5

Listado de secuencias

<110> GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA

10 <120> POLIPÉPTIDOS PARA TRATAR EL CÁNCER

<130> CV - 341/PCT

<160> 17

15

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 13

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 3

25

<400> 1

	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Val	Thr	Pro	Trp	Val	Lys	Ser
	1				5					10			

30

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido 4

<400> 2

	Ile	His	Ser	Lys	Pro	Val	Phe	Ile	Thr	Val	Lys	Met	Asp	Val	Leu	Asn
	1				5					10					15	

40

Ala

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido 168A-T2

50

<400> 3

ES 2 744 474 T3

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

<210> 4
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido 1

<400> 4

Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Val	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Asp	Lys	Ala	Pro	Val
1				5					10					15	
Leu	Leu	Ser	Ser												
			20												

15 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido de control

<400> 5

Asn	Gln	Lys	Gly	Cys	Tyr	Asp	Leu	Val	Thr
1				5					10

25 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNpi CD151 Sentido A

35 <400> 6
 cgagaagaag acaacaugut t 21

40 <210> 7
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNpi CD151 antisentido A

45 <400> 7
 acauguuguc uucuucugt t 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARNpi CD151 sentido B

 10 <400> 8
 ccuccaacau cuacaaggut t 21

 <210> 9
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARNpi CD151 antisentido B
 20
 <400> 9
 accuuguaga uguuggaggt t 21

 <210> 10
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARNpi CD151 sentido C
 30
 <400> 10
 caggucuuug gcaugaucut t 21

 35 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> ARNpi CD151 antisentido C

 <400> 11
 45 agaucaugcc aaagaccugt t 21

 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> ARNpi CD9 sentido A

 <400> 12
 55 ccauccacua ugccuugaat t 21

 <210> 13
 <211> 21
 <212> ARN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARNpi CD9 antisentido A

 <400> 13
 65 uucaacgcau aguggauggt t 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> ARN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARNpi CD9 sentido B

 10 <400> 14
 cuguccugau gccaucaaat t 21

 <210> 15
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARNpi CD9 antisentido B
 20
 <400> 15
 uuugauggca ucaggacagt t 21

 <210> 16
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> ARNpi CD9 sentido C

 <400> 16
 ggcaugaucu ucaguaugat t 21

 35 <210> 17
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> ARNpi CD9 antisentido C

 <400> 17
 45 ucauacugaa gaucaugcct t 21

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 ((i) un péptido de secuencia GNYCYSTPWWKS (SEQ ID NO: 1);
 (ii) un péptido de secuencia IHSKPVFITVKMDVLNA (SEQ ID NO: 2);
 (iii) un fragmento funcional de las SEQ ID NO: 1 o 2; y
 (iv) un derivado funcional de las SEQ ID NO: 1 o 2, en el que dicho derivado corresponde a las SEQ ID NO: 1 o 2
 10 modificado por la adición de uno o más grupos funcionales seleccionados de un grupo fosfato, acetato, lípido o
 carbohidrato, y/o mediante la adición de uno o más grupos protectores; y,
- en el que dicho fragmento funcional tiene la misma función antiangiogénica que las SEQ ID NO: 1 o 2; y,
 en el que dicho polipéptido comprende menos de 50, preferiblemente menos de 40, preferiblemente menos de 30,
 15 preferiblemente menos de 20 aminoácidos contiguos de una SEQ ID NO: 3.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido se modifica mediante la adición de
 uno o más grupos funcionales tales como un grupo fosfato, acetato, lípido o carbohidrato, y/o mediante la adición de
 uno o más grupos protectores.
- 20 3. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho polipéptido posee
 actividad antiangiogénica y/o antitumoral.
4. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones
 1 a 3 o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además al menos un agente
 antiangiogénico, citotóxico, quimioterapéutico o anticancerígeno.
- 30 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, que comprende además
 un complejo de platino seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y/o carboplatino.
8. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 que comprende:
- 35 - un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende un péptido de la SEQ ID
 NO: 1, y un péptido de la SEQ ID NO: 2; o
 - un primer polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende un péptido de la
 SEQ ID NO: 1, y un segundo polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende
 40 un péptido de la SEQ ID NO: 2.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que dicha
 composición está en una forma adecuada para administración tópica, sistémica, oral, subcutánea, transdérmica,
 intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.
- 45 10. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica de
 acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para usar en el tratamiento de una enfermedad relacionada con
 la angiogénesis, en la que dicha enfermedad se selecciona de enfermedades neovasculares oculares, aterosclerosis,
 artritis, psoriasis, obesidad y enfermedad de Alzheimer.
- 50 11. El polipéptido o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha
 enfermedad neovascular ocular se selecciona de retinopatía isquémica, retinopatía diabética, retinopatía del
 prematuro, oclusiones de venas retinianas, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal
 y glaucoma neovascular.
- 55 12. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica de
 acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en el tratamiento del cáncer y/o de tumores en el
 cuerpo humano o animal.
- 60 13. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que las células cancerosas expresan CD9P-1.
14. Un polipéptido o composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer y/o tumor en un sujeto que lo
 necesite de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que antes del tratamiento, la expresión de CD9P-1 se prueba
 en una muestra que comprende células de cáncer y/o tumorales del sujeto.
- 65

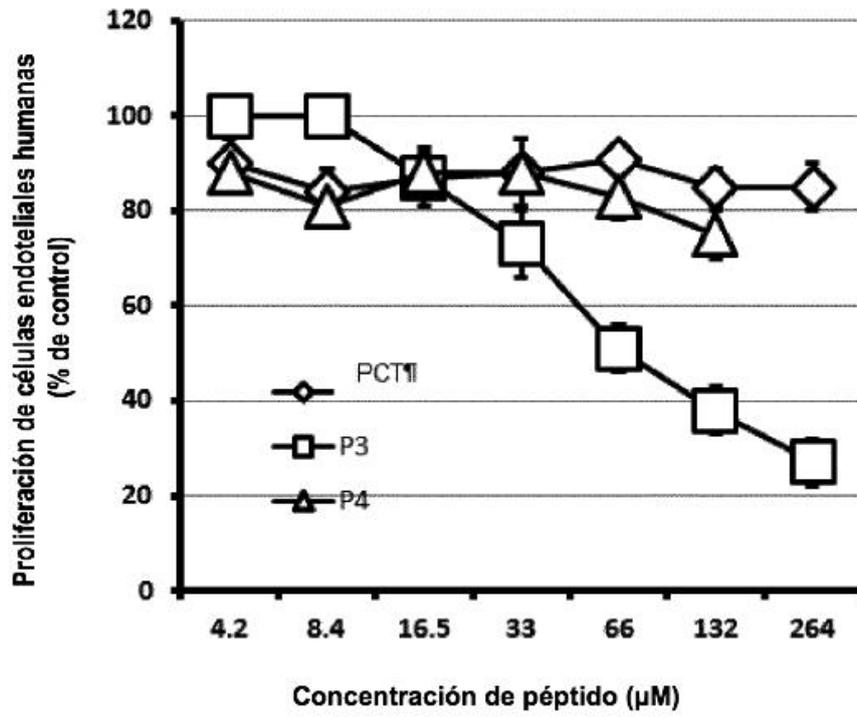


FIG. 1

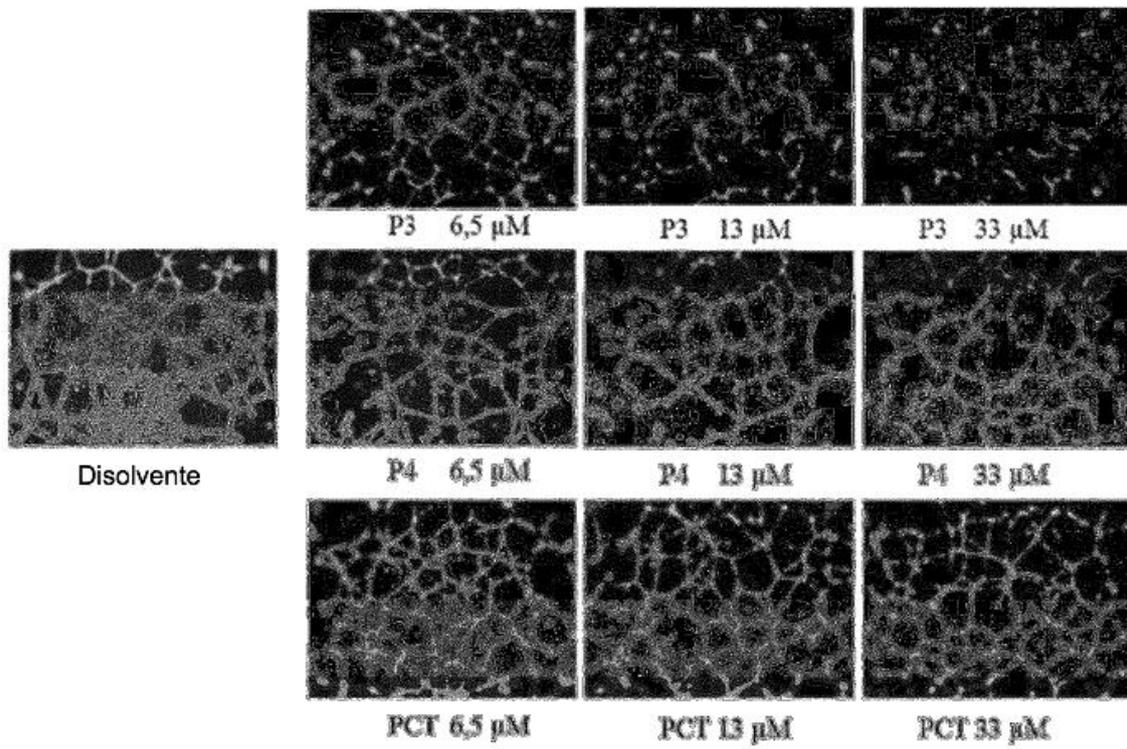


FIG. 2

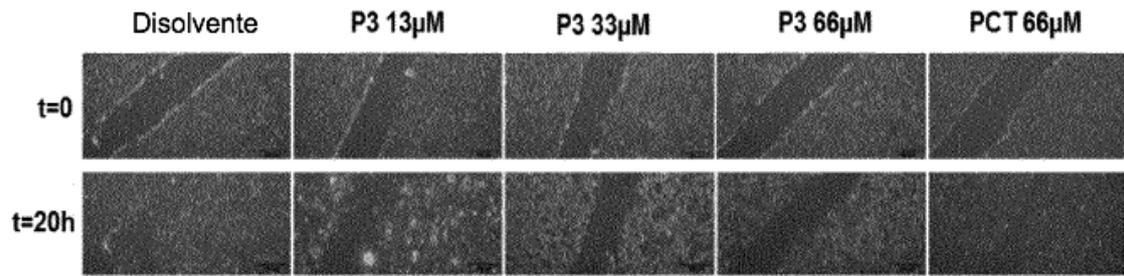


FIG. 3

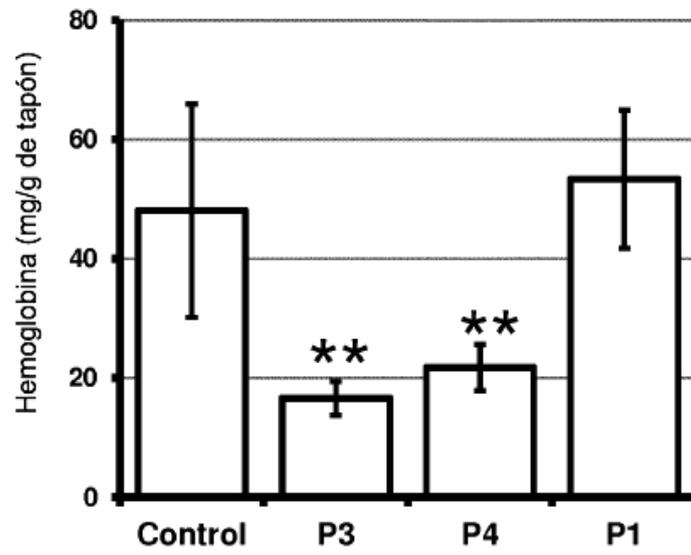


FIG. 4

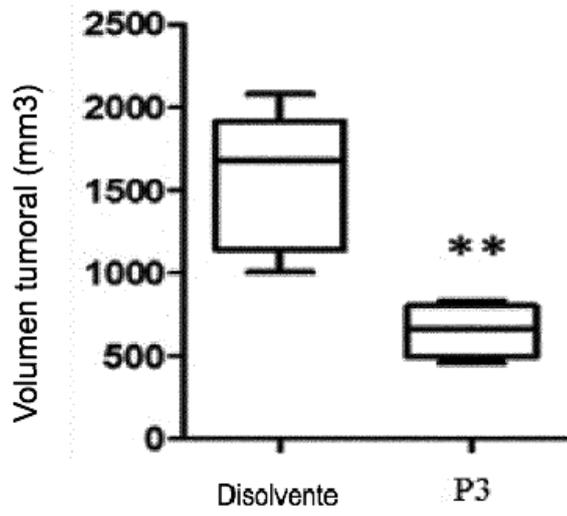


FIG. 5

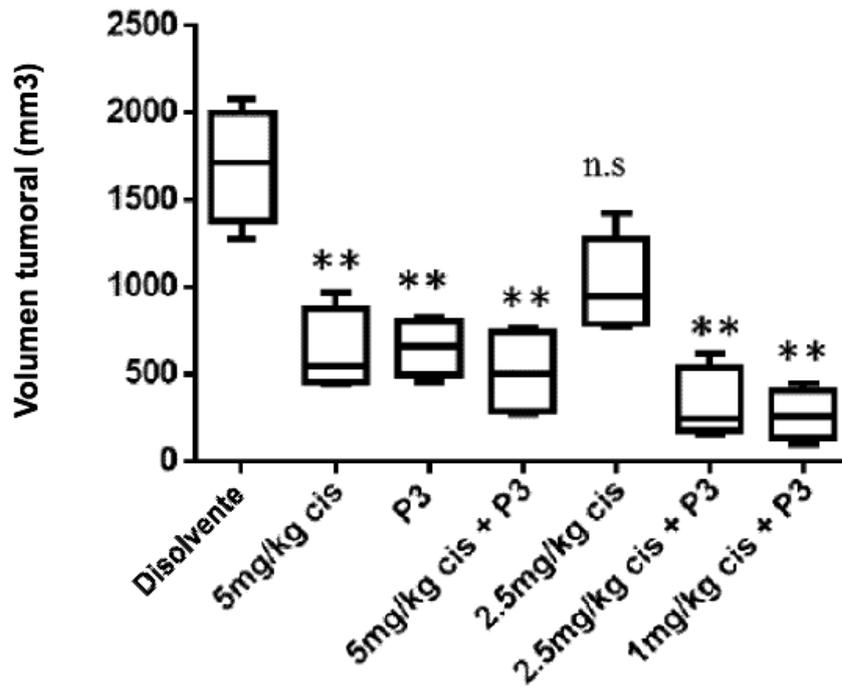


FIG. 6

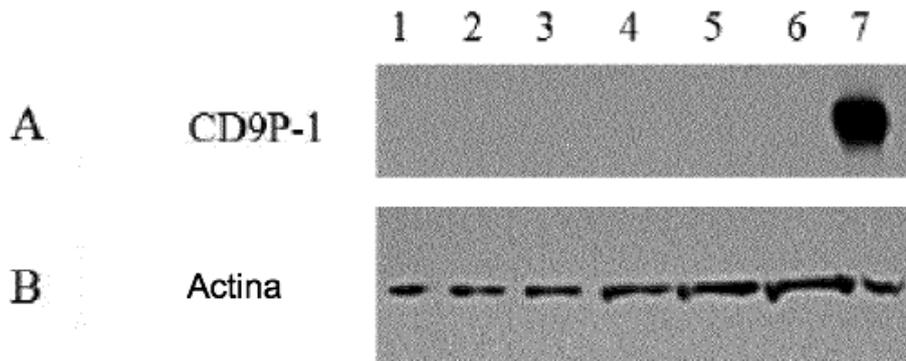


FIG. 7

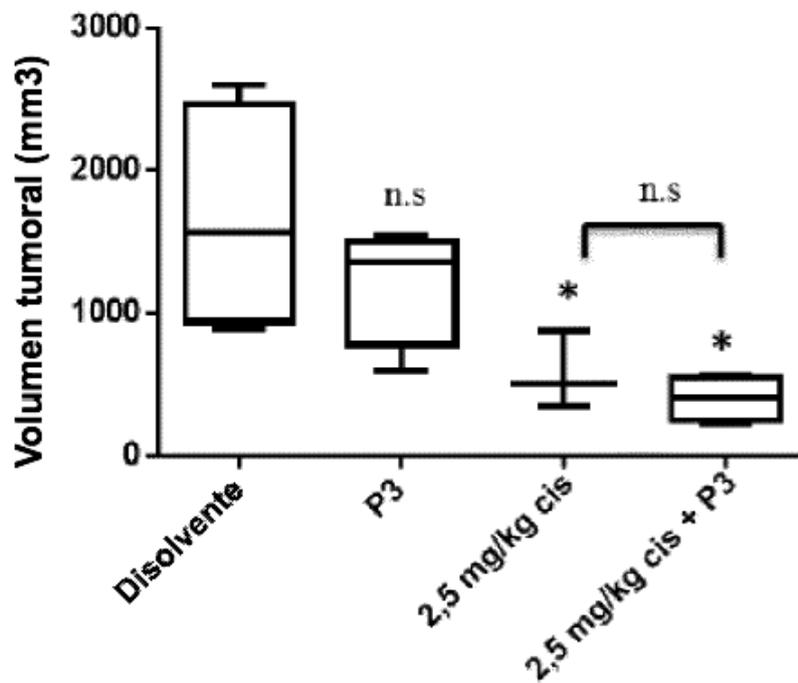


FIG. 8

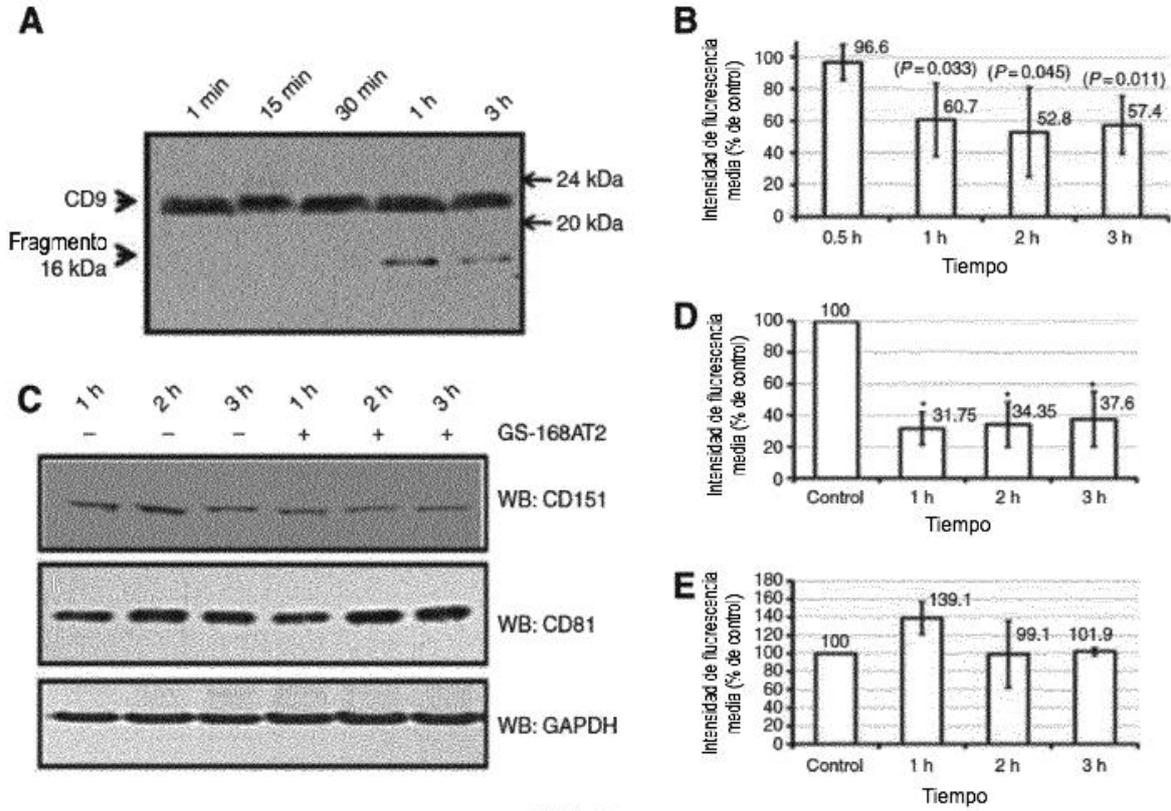


FIG. 9

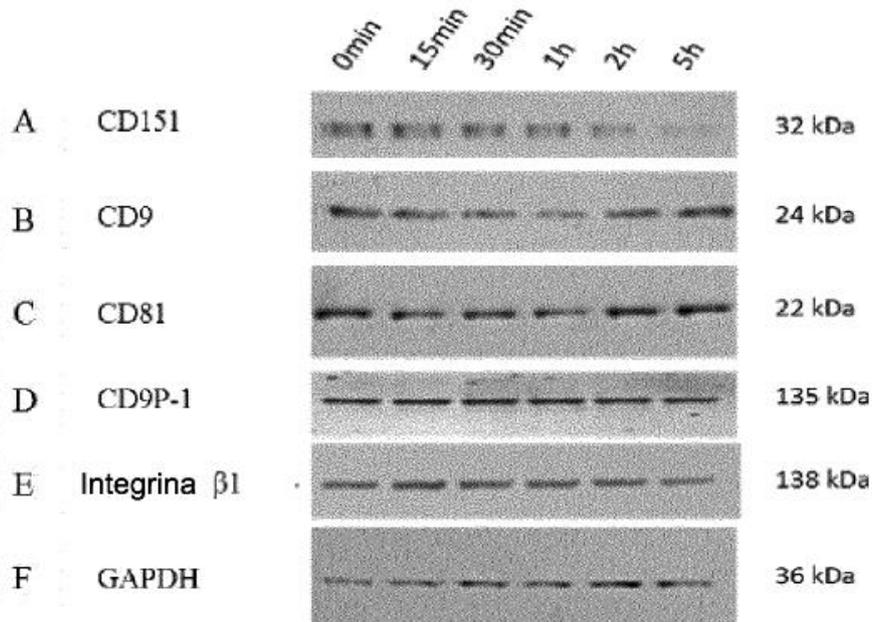
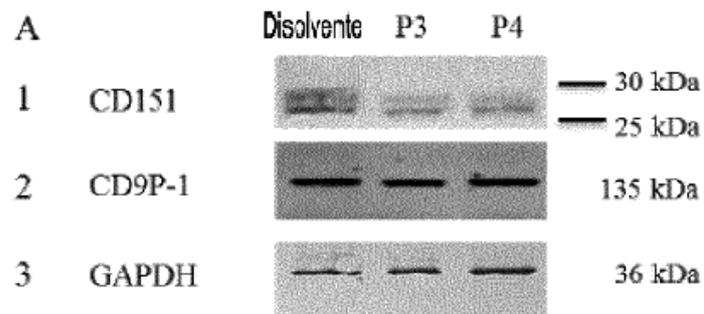


FIG. 10



B

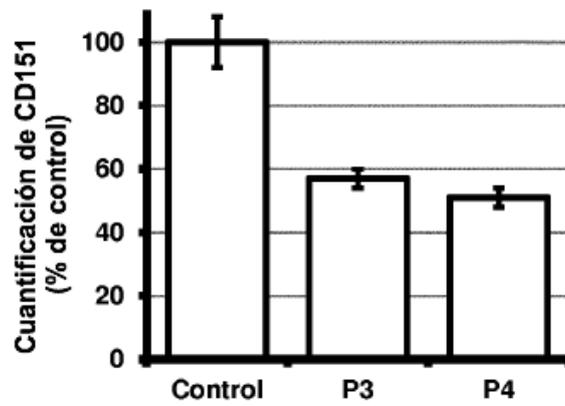


FIG. 11A-B

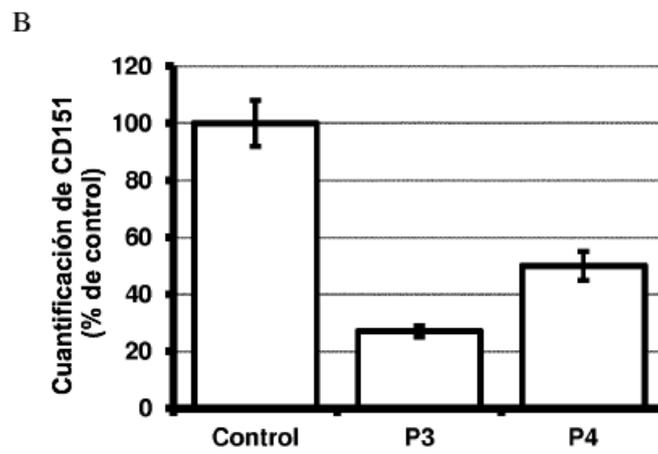
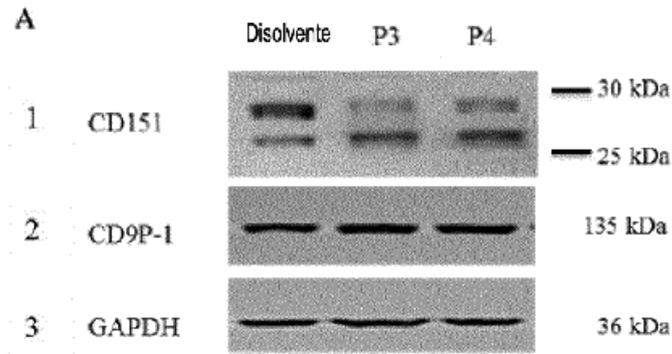


FIG. 12A-B

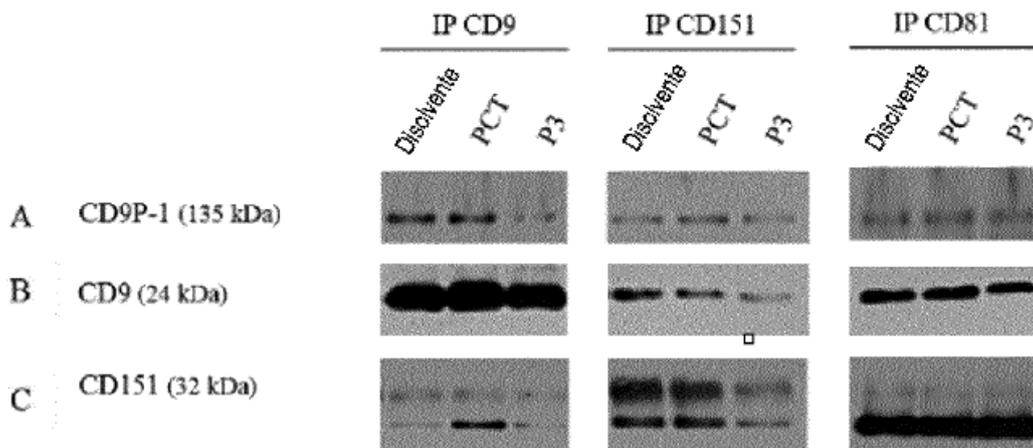


FIG. 13

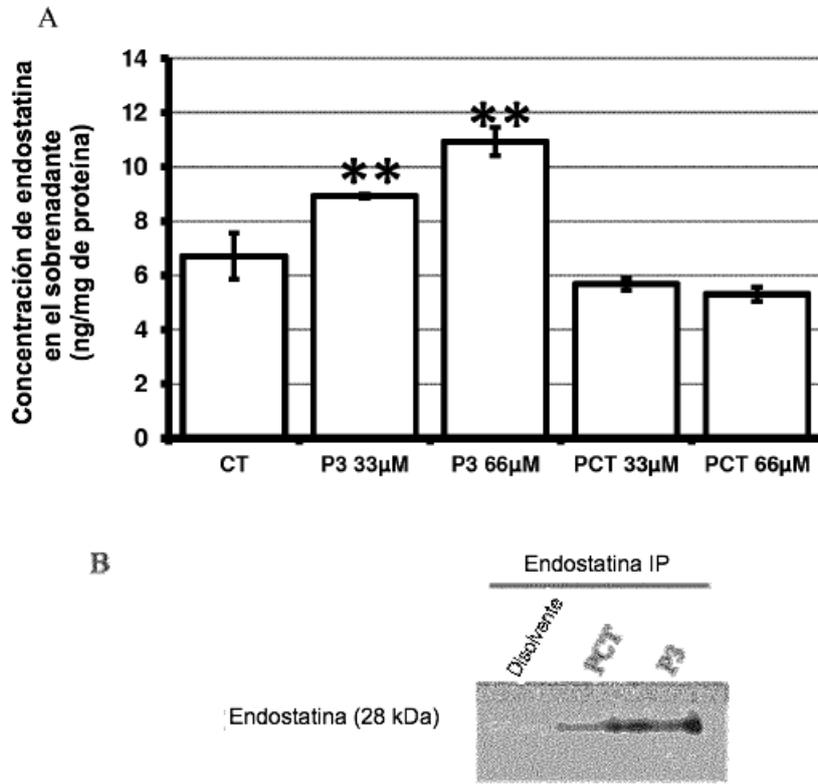


FIG. 14A-B

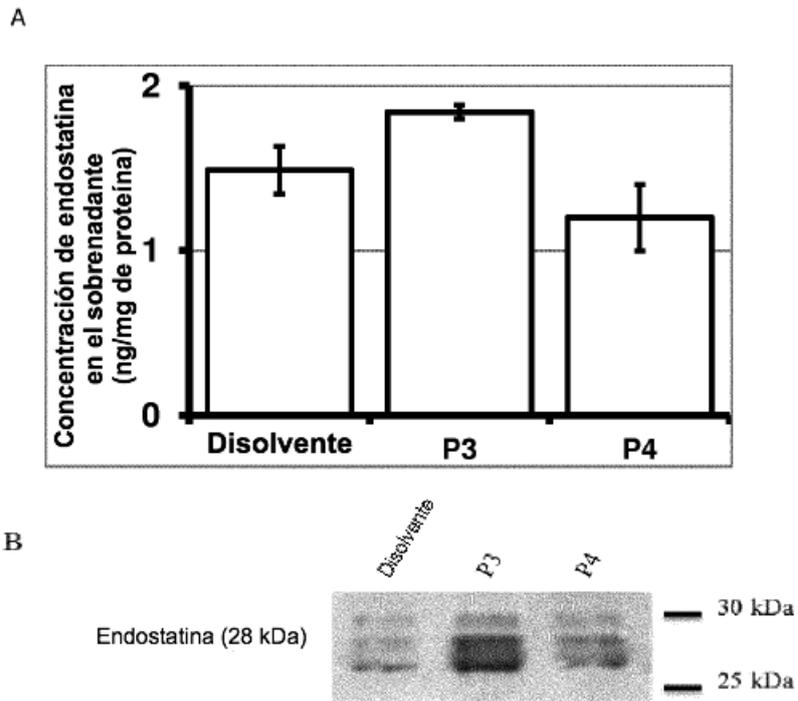


FIG. 15A-B

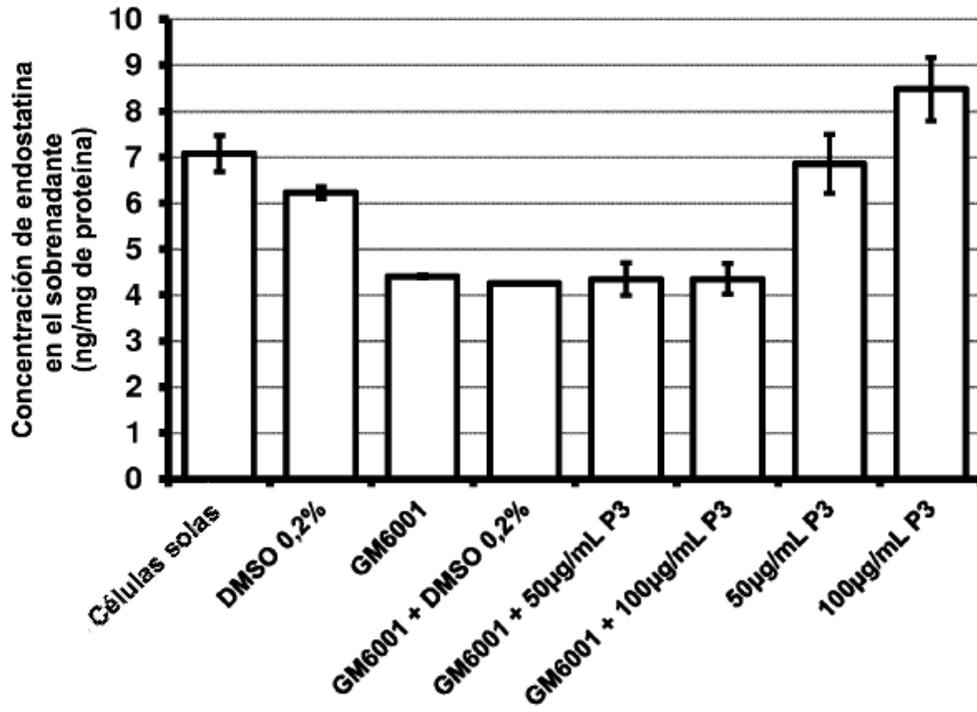


FIG. 16

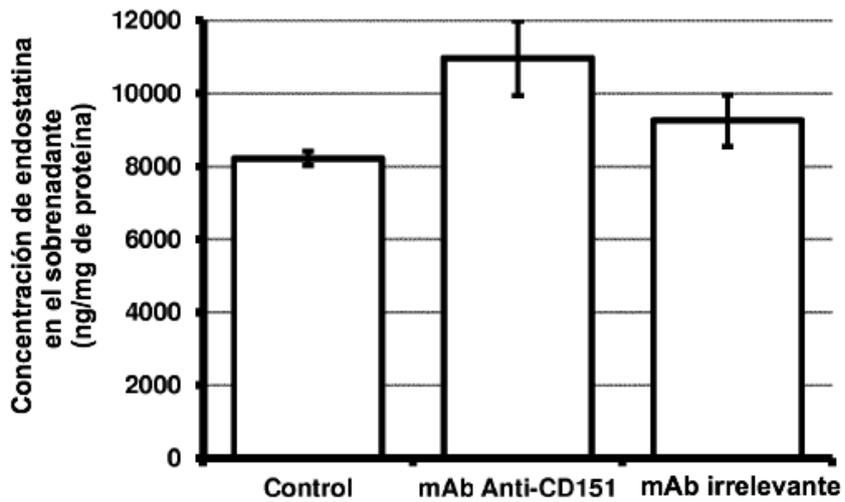


FIG. 17

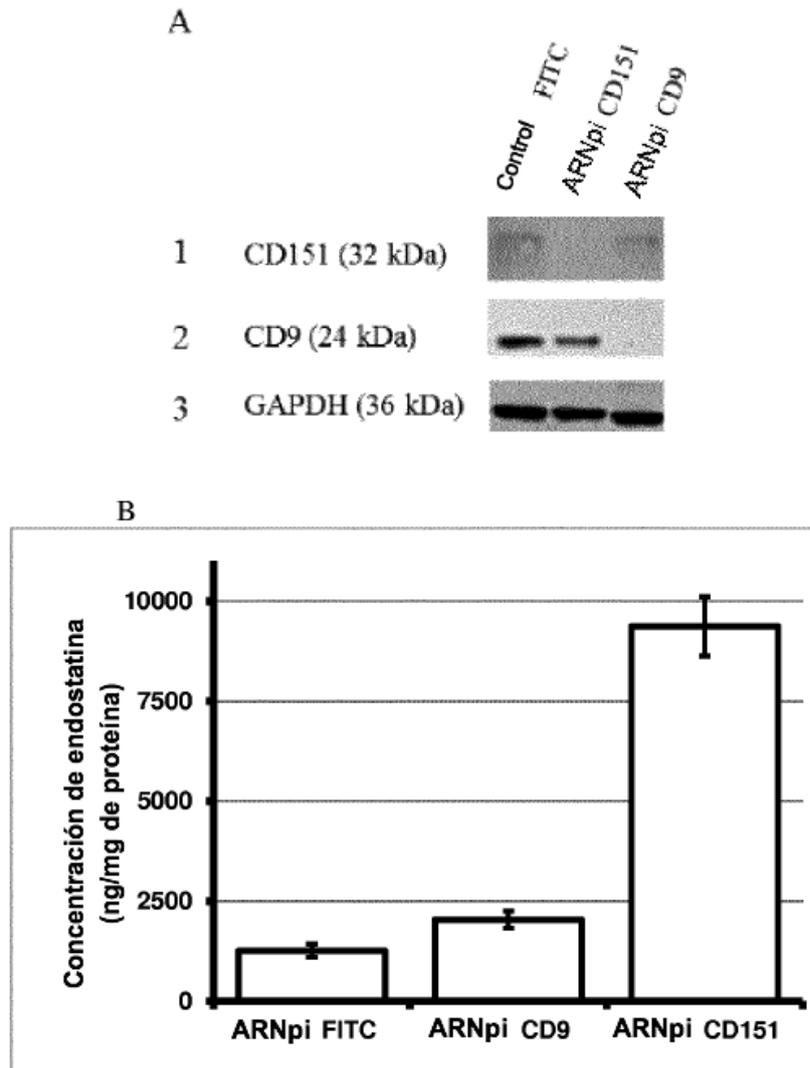


FIG. 18A-B

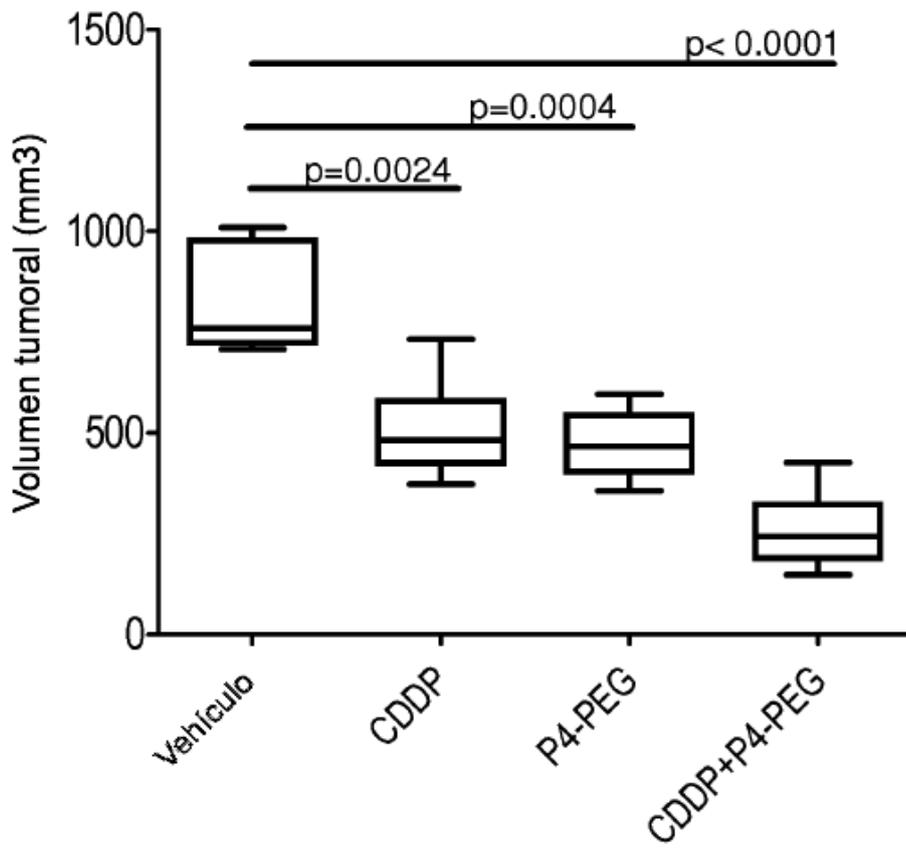


FIG. 19