

**Clarke, Mod**

COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-159776-00003-0000

Fecha: 2011-10-20 14:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 104

P-2779

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 10.159.776

Solicitud de Patente a nombre de **THE BOARD OF REGENTS OF  
THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53 Piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM**, domiciliada en Austin Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, me permito informar lo siguiente:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo descriptivo, nuevo listado de secuencias y nuevo capítulo reivindicatorio que ahora consta de 37 cláusulas y en donde se realizaron las siguientes modificaciones:

**1.1 En el capítulo descriptivo y en el listado de secuencias**

El nuevo listado de secuencias incluye secuencias que se encontraban reveladas en la descripción, las cuales debido a un error habían sido dejadas por fuera del listado de secuencias anterior.

Así, se enmendó la descripción con el fin guardar correspondencia con el nuevo listado de secuencias allegado. En la nueva descripción se incluyeron los números de secuencias, y se hizo la corrección de errores tipográficos. Los párrafos modificados fueron los siguientes: [0011], [0013], [0024], [0026], [0027], [0034], [0039], [0040], Tabla1, [0042], [0068], [0124], [0127], Tabla 2, [0133], [0134], [0136], [0137], [0138], [0139], Tabla 3, Tabla 4, y [0149].

**1.2 En el capítulo reivindicatorio**

En cuanto a estas modificaciones, atentamente nos permitimos manifestar que las mismas no amplían de ninguna manera la materia originalmente presentada en la solicitud en estudio.

Atentamente acompañamos el recibo de caja con el cual queda cubierta la tasa por la modificación de la solicitud y formulario de modificaciones debidamente diligenciado.

Señor Superintendente,

  
**DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**  
CC. 41.654.882  
TP 20824 CSJ

**FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES**

**SOLICITUD DE:**

1

☐

Corrección de error material

☒

Modificación a una solicitud.

2

**SOLICITANTE  
(71)**

Nombre: **THE BOARD OF REGENTS OF THE  
UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM**

Dirección: 201 W. 7th St. Austin, Texas 78701,  
Estados Unidos de América

Nacionalidad o domicilio: Austin, Texas, Estados  
Unidos de América

Lugar de Constitución: Texas, Estados Unidos

Teléfono:

Fax:

E-mail

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual \_\_\_\_\_

Número \_\_\_\_\_

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO  
(74)**

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ  
D'ALEMAN**

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088

Fax: 6350824

E-mail: [clarkemodet@clarkemodet.com.co](mailto:clarkemodet@clarkemodet.com.co)

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual \_\_\_\_\_

Número 41.654.882  
TP 20824 CSJ

4 Número del expediente: 10.159.776

5. Descripción de la corrección o modificación solicitada: Que se anote: Se presenta nuevo capítulo descriptivo, nuevo listado de secuencias y nuevo capítulo reivindicatorio que ahora consta de 37 cláusulas.

6. Comprobante de pago No. 11-0087498, 11-0097814, 11-0097755, 11-0097756

**7 Anexos:**

☒

Comprobante de pago de la tasa

☐

Poderes si fuese el caso

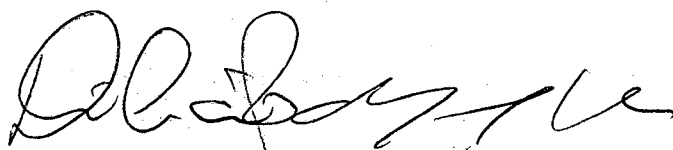
☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8

**NOMBRE : DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN**

**FIRMA:**



C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

  
Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0087498

Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2011 - 16:44:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 325037926 | 07/09/2011 | 51.575.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 5.000.00      | 5.000.00     |
|       |                                                     |                                    |               | \$5.000.00   |

SON: \*\*CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-159776-00003-0000

Fecha: 2011-10-20 14:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 104

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 7 de 2011 - 16:45:21

P30  
2779

4

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**NIT : 800.176.089-2**

- / -



**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0097814**

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 325084605 | 05/10/2011 | 77.805.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO           | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|--------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 21 CERTIFICACIONES | 14.000.00      | 14.000.00    |
|       |                                                     |                    |                | \$14.000.00  |

**SON: \*\*CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 10-159776- -00003-0000**

Fecha: 2011-10-20 14:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 104

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mai: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 16:45:11

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**NIT : 800.176.089-2**

- / -



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0097755**

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 325084605 | 05/10/2011 | 77.805.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO        |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 50.000.00    | 50.000.00          |
|       |                                                     |                                    |              | <u>\$50.000.00</u> |

**SON: \*\*CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 10-159776- -00003-0000**

Fecha: 2011-10-20 14:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 104

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mai: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 16:45:10

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

NIT : 800.176.089-2

- / -



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0097756**

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 325084605 | 05/10/2011 | 77.805.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO       |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 50.000.00      | 50.000.00          |
|       |                                                     |                                    |                | <b>\$50.000.00</b> |

**SON: \*\*CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 10-159776- 00003-0000**

Fecha: 2011-10-20 14:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 104

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 16:45:10

7

## **DESCRIPCIÓN**

### **Péptidos de Señalización de la CRKL**

[0001] Esta solicitud reclama prioridad sobre la Solicitud Estadounidense No. 61/074,423 presentada el 20 de junio, 2008, cuya revelación completa se incluye aquí  
5 específicamente como referencia en su totalidad sin renuncia a las reivindicaciones.

[0002] Esta invención fue hecha con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo los subsidios PC050442 de los Institutos Nacionales de Salud y el Departamento de Defensa. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

## **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

### **1. Campo de la Invención**

[0003] La presente invención concierne a los campos de medicina molecular y a la  
10 administración dirigida de agentes terapéuticos y de detección. Más específicamente, la presente invención se refiere a la identificación de nuevas secuencias de los péptidos que identifican cánceres selectivamente para el tratamiento y detección del cáncer.

### **2. Descripción del Arte Relacionado**

[0004] El tratamiento terapéutico de muchos estados de las enfermedades humanas está limitado por la toxicidad sistémica de los agentes terapéuticos utilizados. Los agentes  
15 terapéuticos del cáncer en particular presentan un índice terapéutico muy bajo, en donde los tejidos normales de rápido crecimiento tales como la piel y la médula ósea son típicamente afectados a concentraciones de agente que no son mucho más altas que las concentraciones usadas para matar las células tumorales. El tratamiento y diagnóstico del cáncer se facilitaría enormemente con el desarrollo de composiciones y métodos para la  
20 administración dirigida a las células cancerosas, más específicamente, con el uso de anticuerpos o péptidos dirigidos a los tumores que se unen a los objetivos que se encuentran en las superficies de las células cancerosas, pero que no se encuentran en los tejidos normales. Dichos objetivos, que deben tener una homología mínima con las otras moléculas de la superficie de las células, son difíciles de encontrar.

25 [0005] Recientemente, se desarrolló un sistema de selección *in vivo* usando de exposición de fagos para identificar los péptidos dirigidos a los órganos o tejidos en un sistema modelo de ratón. Dichas librerías pueden ser generadas mediante la inserción

aleatoria de oligonucleótidos en los cADNs que codifican una proteína de la superficie del fago, generando colecciones de partículas de fago que muestran péptidos únicos en tantas como 10e9 permutaciones (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Arap *et al.*, 1998; Pasqualini *et al.*, 2001). La administración intravenosa de librerías de exposición de fagos en ratones con tumores fue seguida por una recuperación del fago del xenoinjerto del tumor y se caracterizaron los péptidos que señalan el tumor, capaces de realizar una dirección selectiva hacia el tumor. Se recuperaron fagos que eran capaces de realizar una dirección selectiva hacia los lechos vasculares de diferentes órganos o tejidos de los ratones, en base a secuencias de péptidos de dirección específica expresadas en la superficie exterior del fago (Pasqualini y Ruoslahti, 1996). Cada uno de esos péptidos que señalan los tumores se unieron a receptores que fueron expresados selectivamente o regulados hacia arriba en la superficie de las células tumorales.

[0006] La unión de agentes terapéuticos a los péptidos de señalización dio como resultado la administración selectiva del agente a un órgano o tejido deseado en el sistema modelo del ratón. La administración dirigida de los agentes quimioterapéuticos y péptidos proapoptóticos a receptores ubicados en la vasculatura tumoral angiogénica dio como resultado un marcado incremento de la eficacia terapéutica y una disminución de la toxicidad sistémica en modelos de ratones con tumores (Arap *et al.*, 1998a, 1998b; Ellerby *et al.*, 1999).

[0007] CRKL (virus número 10 de tumores en pollos regulador de proteína tipo quinasa), una proteína adaptadora, es un homólogo del oncogen v-crk. Contiene un dominio SH2 y dos dominios tándem SH3. La CRKL intracelular está implicada tanto en la MAP quinasa como en las vías comunicadas por integrinas (Li *et al.*, 2003; Uemura *et al.*, 1999). Además, la CRKL tiene un potencial oncogénico.

[0008] Actualmente, los pacientes con cáncer son tratados habitualmente con quimioterapia y radioterapia sistémicas. Sin embargo, dichos tratamientos con frecuencia están plagados de efectos colaterales muy conocidos y una eficacia limitada. Claramente existe la necesidad de nuevas composiciones y métodos para la administración dirigida de agentes terapéuticos y de diagnóstico.

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0009] La presente invención supera las deficiencias del arte previo proporcionando métodos y composiciones para señalar selectivamente la CRKL secretada a través del uso de péptidos de señalización. La señalización selectiva de la CRKL secretada a través del

uso de un péptido de señalización se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer para administrar un compuesto quimioterapéutico, una proteína de fusión, o constructo de fusión a una célula o tejido canceroso.

[0010] Para entender mejor los mecanismos de transducción de señales a través de las membranas celulares en el cáncer, los inventores se propusieron descubrir interacciones funcionales de las proteínas en un modelo de xenoinjerto de tumor. Los inventores razonaron que un enfoque combinatorio (Hajitou *et al.*, 2006; Arap *et al.*, 2002; Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2004; Pasqualini y Ruoslahti, 1996) tal como una selección en serie de librerías aleatorias de péptidos mediante 'phage display' *in vivo* podría proporcionar claves mediante la emulación imparcial de uniones ligando-receptor dentro del contexto del microambiente del tumor. Tal como se muestra en los ejemplos más adelante, se observó una interacción específica entre la proteína de señalización intracelular CRKL y un dominio extracelular de integrina  $\beta_1$  regulatorio (más que de fijación de ligandos). Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la CRKL señala el dominio de la plexin-semaforin-integrina (PSI) de la integrina  $\beta_1$  ubicada fuera de la célula, dispara las MAP quinasas, y promueve el crecimiento y supervivencia celular. Sin desear limitarnos a alguna teoría, estos resultados sustentan la idea de que existe una función no reconocida de afuera hacia dentro mediada por una integrina para los mediadores intracelulares, tal como proteínas que contienen SH3, en la activación de la vía MAP quinasa.

[0011] Un aspecto de la presente invención se relaciona con un péptido aislado que señala tumores que comprende una unidad de unión CRKL, en donde dicha unidad se define como que: tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos, tiene un grado de similitud al mejor alineamiento de secuencia correspondiente a la integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos el 25%; y en donde el péptido de señalización tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos y se fija bajo condiciones fisiológicas a las células que expresan la CRKL. La unidad de fijación de la CRKL puede tener un grado de similitud al mejor alineamiento de secuencia a la integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 60%. En ciertas realizaciones, el péptido tiene una secuencia que no es idéntica al mejor alineamiento de secuencia a la integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13). En ciertas realizaciones, la unidad de fijación de la CRKL puede tener un mejor alineamiento de secuencia a una integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13) región de dominio PSI. La unidad de fijación de la CRKL puede tener el mejor alineamiento de secuencia para una integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13) PSI región de dominio PSI seleccionada del grupo que consiste de aminoácidos de 6 a 10, 10 a 29; 15 a 34; 18 a 37; 36 a 55; 39 a 58; 45 a 64; 94 a 113; 196 a 215; 198 a 213; 203 a 222; 244 a 263; 330 a 349; 377 a 396; 379 a 398; 380 a

399; 398 a 417; 400 a 419; 413 a 432; 447 466; 460 a 479; 460 a 479; 464 a 483; 469 a 488; 474 a 493; 475 a 494; 512 a 533; 519 a 538; 551 a 570; 574 a 593; 577 a 596; 579 a 598; 590 a 609; 596 a 615; 613 a 632; 615 a 634; 616 a 635; 644 a 663; 648 a 667; 663 a 682; 674 a 693; 682 a 701; 721 a 740; 727 a 746; y 779 a 798. En ciertas realizaciones, la  
 5 unidad de fijación de la CRKL tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:78 hasta SEQ ID NO:123.

[0012] En ciertas realizaciones, el péptido aislado se puede definir además como un péptido cíclico que es capaz de ser preparado en una forma cíclica, tal como un péptido que tiene un residuo de cisteína ("C") en ambas terminaciones, que puede, cuando se desea, ser  
 10 provisto en forma cíclica, como por ejemplo a través de la formación de una di-cisteína (*i.e.*, cistina). Dichos péptidos cíclicos pueden ser de particular importancia debido a que los enlaces bisulfuros en los péptidos los hacen notablemente estables a la degradación química, térmica o enzimática. Dichos péptidos cíclicos pueden ser particularmente importantes en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, en lo que concierne a poca  
 15 disponibilidad, susceptibilidad a la proteólisis y vidas medias *in vivo* cortas.

[0013] Dicho péptido puede ser adherido a una molécula; por ejemplo, la molécula puede ser una proteína y el péptido puede ser conjugado o fusionado a la proteína para formar un conjugado de proteína, en donde el conjugado de proteína no es una proteína que ocurre naturalmente. El péptido puede ser posicionado en una terminación de la proteína.  
 20 Dicha molécula puede ser un agente pro-apoptosis, un agente anti-angiogénico, una citocina, un agente citotóxico, una droga, un agente quimioterapéutico, una hormona, un factor de crecimiento, un antibiótico, un anticuerpo o fragmento o cadena simple del mismo, un factor de supervivencia, un agente anti-apoptótico, un antagonista de hormonas, un antígeno, un péptido, una proteína, un agente de diagnóstico, un radioisótopo, o un  
 25 agente de imágenes. Dicha molécula puede ser un agente pro-apoptosis seleccionado del grupo que consiste de gramicidina; magainin; melitina; defensina; cecropina; (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70); (KLAKKLA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:71); (KAAKKAA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:72); (KLGKKLG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:73); Bcl-2; Bad; Bak; Bax; y Bik. En ciertas realizaciones, dicho agente pro-apoptosis es (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70). La SEQ ID  
 30 NO:70 puede consistir de D aminoácidos.

[0014] En otras realizaciones, dicha molécula puede ser un agente anti-angiogénico seleccionado del grupo que consiste de trombospondina, una angiostatina, factor de pigmento derivado del epitelio, angiotensina, laminina péptidos, fibronectina péptidos, inhibidores del activador de plasminogen, inhibidores de la metaloproteinasas del tejido,

interferones, interleucina 12, factor plaquetario 4, IP-10, Gro- $\beta$ , trombospondina, 2-metoxioestradiol, proteína relacionada a la proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, pentosano polisulfato, angiopoietina 2, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, Docetaxel, poliaminas, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de la quinasa, un péptido de señalización, accutin, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4, minociclina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de la hemopexina de terminal C de la matriz metaloproteínasa-2, el dominio kringle 5 del plasminógeno humano, una proteína de fusión de endostatina y angiostatina, una proteína de fusión de endostatina y el dominio kringle 5 del plasminógeno humano, la monoquina inducida por el interferón gamma (Mig), una proteína de fusión de la Mig e IP10, FLT-1 soluble (receptor tirosina quinasa 2 tipo aleta), o insertar dominio quinasa del receptor (KDR). Dicha molécula puede ser una citoquina seleccionada del grupo que consiste de interleuquina 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferón- $\gamma$  (IF- $\gamma$ ), IF- $\alpha$ , IF- $\beta$ , un factor de necrosis del tumor, o GM-CSF (factor de estimulación de colonia de macrófagos granulocitos).

[0015] Dicho péptido puede ser adherido a un complejo macromolecular, como por ejemplo un virus, un bacteriófago, una bacteria, un liposoma, una micropartícula, una cuenta magnética, una célula de levadura, o una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, dicho péptido está adherido a un virus, como por ejemplo un lentivirus, papovavirus, adenovirus, retrovirus, AAV, vaccinia virus o virus del herpes. Dicho péptido puede estar adherido a un soporte sólido, como una placa microtiter o un microchip.

[0016] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un constructo que comprende obtener un péptido de acuerdo con la presente invención y adherir el péptido a una molécula para preparar el constructo.

[0017] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para dirigir la administración de un péptido, molécula o proteína a células que expresan CRKL, en donde el método comprende los pasos de: obtener un péptido de acuerdo con la presente invención, o preparado por el método anterior, y administrar el péptido a una población de células, en donde la población de células incluye células que expresan la CRKL, para de esta forma administrar la molécula o proteína a dichas células. Las células que expresan la CRKL pueden estar en un sujeto, y el péptido o constructo de fusión de proteínas pueden ser formulados en una composición farmacéuticamente aceptable y la composición puede ser administrada al sujeto. El sujeto puede ser un sujeto humano. En ciertas realizaciones, el

método se define además como un método de detección y el método comprende además detector el péptido, molécula o proteína que ha sido administrada a las células. El sujeto puede tener una enfermedad o trastorno y el método puede definirse además como un método terapéutico. El sujeto puede tener un cáncer, como por ejemplo cáncer de próstata, seno, sarcoma, encía, lengua, pulmón, piel, hígado, riñón, ojo, cerebro, leucemia, mesotelioma, neuroblastoma, cabeza, cuello, pancreático, renal, de hueso, testicular, ovárico, mesotelioma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebro, colon y vejiga.

[0018] Se pueden usar realizaciones discutidas en el contexto de un método y/o composición de la invención con respecto a cualquier otro método o composición descrita en este documento. Así, una realización que pertenece a un método o composición también puede ser aplicada a otros métodos y composiciones de la invención.

[0019] Tal como se usa en esta especificación, "un" o "una" puede significar uno(a) o más. Tal como se utiliza aquí en la(s) reivindicación(es), cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno(a) o más de uno(a).

[0020] El uso del término "o" en las reivindicaciones significa "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere sólo a las alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la revelación sustenta una definición que se refiere a alternativas únicas y "y/o". Tal como se usa aquí, "otro(a)" puede significar por lo menos un(a) segundo(a) o más.

[0021] En toda esta solicitud, el término "alrededor de" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

[0022] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que aunque la descripción detallada y los ejemplos específicos indican realizaciones preferidas de la invención, se dan sólo a modo de ilustración, puesto se varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán aparentes para los expertos en el arte a partir de esta descripción detallada.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0023] Los siguientes dibujos son parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar otros aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse

mejor haciendo referencia a los dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

[0024] **FIG. 1A-C:** Señalización e internalización de péptidos en células cancerosas. **FIG. 1A**, el péptido fago YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) se une a la superficie de las células en células DU145. Un clon de fago que muestra la secuencia RGD-4C (Arap *et al.*, 1998) sirvió como un control positivo y fd-tet (sin insertos) como un control negativo. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  media de las placas triplicadas. **FIG. 1B**, inmunolocalización del fago dirigido al tumor en la superficie celular de células KS1767 no permeabilizadas. **FIG. 1C,D**, el péptido sintético YRCTLNSPFFWEDMTHECHAGG-D(KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:67), permite la internalización dentro de las células DU145 medidas por la viabilidad celular usando un reactivo WST-1 y un anticuerpo anti-anexina-V FITC.

[0025] **FIG. 2A-C:** Alineamiento de secuencia de péptidos dirigidos al tumor e integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13). **FIG. 2A**, el péptido dirigido al tumor YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) se adapta al dominio plexin-semaforin-integrina (PSI) (región de secuencia 26-78 residuos) (SEQ ID NO:12). **FIG. 2B**, alineamiento de secuencia de todas las ocho subunidades de integrina  $\beta$  (SEQ ID NO:14-21) y la secuencia del péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1). **FIG. 2C**, alineamiento de secuencia de todos los péptidos que se dirigen al tumor (Tabla 1) e integrina  $\beta_1$  (SEQ ID NO:13).

[0026] **FIG. 3A-D:** Fijación del receptor por parte de los péptidos. **FIG. 3A**, la His-tag CRKL (rCRKL) recombinada, el dominio rCRKL-SH3 (N), y el dominio rCRKL-SH3 (C) se fijan al péptido dirigido al tumor-YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1). **FIG. 3B**, el His-tag rCRKL recombinado, el dominio rCRKL-SH3 (N), y el dominio rCRKL-SH3 (C) se fijan al péptido sintético NSTFLQEGMPTSA (SEQ ID NO:23) correspondiente a una región en el dominio PSI. **FIG. 3C**, la proteína de fusión gst recombinada de todo el dominio PSI (residuos 22-82. SEQ ID NO: 74 CLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALKKKKGC), gst-PSI lineal (residuos 48-62, SEQ ID NO: 75 - TNSTFLQEGMPTSAR), gst-PSI cíclico (residuos 26-74, SEQ ID NO: 76 - CTNSTFLQEGMPTSARC) fueron generados para determinar las fijaciones. Tanto las regiones lineales como las cíclicas derivadas del PSI se fijan a la CRKL. **FIG. 3D**, la actividad de fijación del péptido dirigido al tumor al dominio rCRKL-SH3 (C) es inhibida por el péptido (YRCTLNSPFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:1) dirigido al tumor, por el péptido (NSTFLQEGMPTSA; SEQ ID NO:23) derivado del PSI o

por el fago dirigido al tumor que expone la SEQ ID NO:1. Las barras representan la desviación media estándar  $\pm$  de los pocillos triplicados.

[0027] **FIG. 4A-D:** La interacción entre la CRKL y los péptidos de fijación. **FIG. 4A**, las propiedades de fijación del rCRKL-SH3 (C) al péptido dirigido al tumor. Un Pro→Ala en SEQ ID NO:1 se proporciona como SEQ ID NO:25. Análisis de mutación del dominio CRKL SH3 (C). **FIG. 4B**, el fago dirigido al tumor (que exhibe YRCTLNSPFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:1) y el fago derivado del PSI (que exhibe CNSTFLQEGMPTSAC; SEQ ID NO:77) se fijan a la CRKL recombinada. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  media de los pocillos triplicados. **FIG. 4C**, esquema del dominio CRKL SH3 (C) (SEQ ID NO:24) y mutantes de supresión de control generados como proteínas recombinadas His-tag. Se generaron y probaron cuatro mutantes:  $\Delta 1$  (residuos suprimidos 236- 256),  $\Delta 2$  (residuos suprimidos 257-277),  $\Delta 3$  (residuos suprimidos 278-293), y  $\Delta$ SH3 (C) (residuos suprimidos 236-293). **FIG. 4D**, la región de fijación está ubicada entre los residuos 236-277 del dominio SH3 (C).

[0028] **FIG. 5:** Interacción proteína-proteína entre la CRKL y la integrina  $\beta_1$ . Una inhibición, que depende de la concentración, de la CRKL que se fija a la integrina  $\beta_1$  por la proteína gst-PSI recombinada (hasta 800  $\eta$ m). Las integrinas  $\alpha v \beta 3$  y  $\alpha v \beta 5$  sirvieron como controles. Se muestran las desviaciones estándar de la media a partir de los pocillos triplicados.

[0029] **FIG. 6A-B:** Localización de la superficie celular de la CRKL. **FIG. 6A**, análisis de citometría de flujo de la CRKL en células DU145. Se realizó la inmunomarcación usando anti-CRKL (\*\*) monoclonal, integrina (\*) anti- $\beta_1$ , y anticuerpos anti-AHSG (c, control). **FIG. 6B**, microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la CRKL que muestra partículas de CRKL-oro individuales en la superficie celular (puntas de flecha). Las células DU145 usadas en estudios fueron fijadas sin permeabilización. Un anticuerpo policlonal anti-CRKL fue usado en los estudios. Se indican las barras de escala.

[0030] **FIG. 7A-C:** Secreción de CRKL. **FIG. 7A**, Varios tipos de células cancerosas cultivadas en un medio libre de suero (SFM) secretan la forma desfosforilada de la CRKL. **FIG. B,C**, el anticuerpo CRKL neutraliza la forma extracelular de la CRKL en el medio y afecta la proliferación y migración celular. Los anticuerpos de control usados fueron los siguientes: receptor anti-IL11, anti-AHSG, anti-grb2, integrina anti- $\alpha_6$ , y anticuerpos pre-inmunes. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  media de los pocillos duplicados.

[0031] **FIG. 8A-D:** Los efectos de eliminación del siRNA de la CRKL. Se muestra la proliferación (**FIG. 8A**) adhesión (**FIG. 8B**) y migración (**FIG. 8C**) celular. Se muestran las desviaciones estándar de la media de los pocillos triplicados. **FIG. 8D**, la CRKL recombinada rescata las células siRNA eliminadas de la CRKL en ensayos de proliferación celular. Las células DU145 fueron transfectadas con CRKL siRNA por 48 horas antes de agregar exógenamente la CRKL recombinada a los pocillos. La proliferación celular fue determinada con el reactivo WST-1.

[0032] **FIG. 9A-D:** Modelo de señalización de tumores y mecanicista. **FIG. 9A**, fijación *in vitro* del fago que se dirige al tumor o los de control (sin insertos, mutante (YRCTLNSAFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:25), o fago (#1: YRFCTSPFHEWHLENTDMCA; SEQ ID NO:26, #2: YRECTDSPHEFHLWNTMCAF; SEQ ID NO:27)) revuelto en rCRKL. **FIG. 9B-D**, la dirección *in vivo* de los constructos de fago señalados o de control en ratones con diferentes tipos de tumores. Fago dirigido al tumor localizado a los tumores de preferencia cuando se compara con los controles. Se muestran los datos representativos de dos experimentos independientes.

[0033] **FIG. 10:** Señalar la inhibición en ratones con tumores. El fago que se dirige al tumor fue pre-incubado con gst de control o gst-CRKL recombinada antes de administrarlo a los ratones desnudos que tienen tumores humanos del mismo tamaño (derivados de DU145). Se observó inhibición en el fago que se dirige al tumor pre-tratado con la CRKL recombinada. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

[0034] **FIG. 11:** Tratamiento de xenoinjertos de tumores con un péptido proapoptótico sintético que se dirige al tumor. Se usaron cohortes de ratones desnudos del mismo tamaño que llevaban xenoinjertos de cáncer de próstata humanos (derivado de DU145). Se observó una marcada reducción del crecimiento tumoral en los ratones con tumores tratados con el péptido proapoptótico sintético que se dirige al tumor YRCTLNSPFFWEDMTHECHAGG-D(KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:67). Cantidades equimolares de YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) o D(KLAKLAK)<sub>2</sub>(SEQ ID NO:70) no mostraron diferencias en el volumen de los tumores en comparación con animales no tratados (Prueba t del estudiante,  $p < 0.001$ ).

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

[0035] La presente invención proporciona tanto los datos que sustentan la importancia y función de la proteína de señalización intracelular CRKL, como los péptidos

que señalan la CRKL. Las membranas celulares han evolucionado para interactuar un control riguroso y dividido en compartimentos entre el contenido intracelular y el medio extracelular (Conner y Schmid, 2003; Cho y Stahelin, 2005). Para mantener dicha homeostasis, las familias de receptores transmembrana transmiten señales bidireccionales a través de la superficie celular mediante una organización espacial y temporal compleja de cascadas de transducción (Martin *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002). Así, la ubicación de las proteínas involucradas en la transducción de señales es esencial para proporcionar especificidad de las respuestas celulares (Cho y Stahelin, 2005; Mochly-Rosen, 1995). Por ejemplo, en un escenario de mecanotransducción prototípica, los receptores de la superficie celular tales como las integrinas sufren cambios de conformación obtenidos a través de la fijación de ligandos para permitir una conversación cruzada con cascadas de transducción de señales como vías quinasas de la proteína activada con mitogen (MAP); los ligandos de integrina convencional incluyen proteínas de matriz extracelular (ECM) en sus dominios extracelulares y proteínas citoóseas en sus dominios intracelulares (Martin *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002; Hunter, 2000; Pawson y Scott, 1997; Blume-Jensen y Hunter, 2001).

[0036] Para saber más sobre los mecanismos de transducción de señales a través de las membranas celulares en el cáncer, los inventores se propusieron descubrir las interacciones funcionales de las proteínas en un modelo de xenoinjerto de tumor. Los inventores razonaron que un enfoque combinatorio (Hajitou *et al.*, 2006; Arap *et al.*, 2002; Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2004; Pasqualini y Ruoslahti, 1996) como por ejemplo una selección en serie de librerías de péptidos aleatorios phage display in vivo podría brindar claves mediante la emulación de una fijación ligando-receptor neutral dentro del contexto del microambiente del tumor. Los siguientes datos indican que existe una interacción específica entre la proteína de señalización CRKL intracelular y un dominio extracelular regulador de la integrina  $\beta 1$  (más que fijación de ligando). Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la CRKL señala el dominio plexin-semaforin-integrina (PSI) de la integrina  $\beta 1$  ubicada fuera de la célula, dispara las MAP quinasas, y promueve el crecimiento y supervivencia celular. Estos resultados sugieren una función no reconocida de afuera hacia dentro mediada por la integrina para los mediadores intracelulares, tales como proteínas que contienen SH3, al activar la vía MAP quinasa.

[0037] Consistente con los datos funcionales agregados presentados en este trabajo, es probable que la CRKL extracelular tenga un rol aún no reconocido en el microambiente del tumor disparando la proliferación y migración celular. Puesto que la fracción intracelular de la CRKL misma también está fosforilada por la adición de rCRKL exógena, uno puede especular que la CRKL extracelular (secretada y/o liberada) puede quizás

funcionar como un factor autocrino o paracrino dentro de los tumores. Estos resultados establecen una conexión nueva inusual entre las moléculas de señalización y los receptores de adhesión celular, en la que su relación en la superficie celular puede disparar eventos de señalización desde el medio extracelular.

5           [0038] Sin desear limitarnos a teoría alguna, en base al modelo estructural “de resorte” para la activación de la integrina (Takagi *et al.*, 2002), los inventores proponen una vía alternativa en la que la CRKL extracelular puede activar integrinas (a partir de una conformación doblada inactiva a una conformación extendida activa) a través de la fijación al dominio PSI de la cadena de integrina  $\beta 1$ . En el modelo multi pasos presentado aquí  
10 (FIG. 6), los siguientes datos demuestran que la CRKL no fosforilada intracelular es secretada por un transporte activo no clásico (quizás vía transportadores ABC) y/o es liberada a por medio de la muerte celular hacia el microambiente del tumor (paso 1), en donde sus dominios SH3 se fijan específicamente al dominio PSI de la integrina  $\beta 1$  en la superficie celular del tumor (paso 2). Luego de la fijación, la conformación de la integrina  
15  $\beta 1$  cambia de doblada a extendida (active), disparando de esta forma la fosforilación descendente de las proteínas de señalización en la vía mediada por la integrina (pasos 3 y 4) y/o vía MAP quinasa (pasos 5-7) y que finalmente afecta la migración y proliferación celular del tumor (paso 8). En línea con estos descubrimientos, han habido varios informes recientes de otras moléculas intracelulares que también pueden ser detectadas en la  
20 superficie celular, incluyendo varias proteínas nucleares (Sinclair y O’Brien, 2002; Hovanessian *et al.*, 2000), factores de transcripción (Monferran *et al.*, 2004), y chaperonas que responden al estrés (Arap *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2003; Mintz *et al.*, 2003). Otras interacciones funcionales ligando-receptor además de la mostrada abajo en los ejemplos pueden existir entre una molécula de señalización secretada y/o liberada que actúa en el  
25 ambiente extracelular y un receptor de adhesión celular y puede tener significancia biológica general.

[0039] La presente invención brinda péptidos que señalan tumores aislados que comprenden una unidad de fijación de CRKL, y dicha unidad se define como que tiene, por ejemplo, una longitud de 6 a 20 aminoácidos, un grado de similitud con el mejor  
30 alineamiento de secuencia correspondiente a la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) de, por ejemplo, por lo menos 25%; y en donde el péptido de señalización puede tener 100 aminoácidos o menos de longitud, y se fija bajo condiciones fisiológicas a las células que expresan CRKL. La unidad de fijación de CRKL puede tener un grado de similitud con el mejor alineamiento de secuencia de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos 40%,  
35 por lo menos 50%, o por lo menos 60%. En ciertas realizaciones, el péptido tiene una

- secuencia que no es idéntica al mejor alineamiento de secuencia de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13). En ciertas realizaciones, la unidad de fijación de CRKL puede tener un mejor alineamiento de secuencia a la región de dominio PSI de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13). La unidad de fijación de CRKL puede tener un mejor alineamiento de secuencia para una
- 5 región de dominio PSI de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) seleccionado del grupo que consiste de 10 a 29; 15 a 34; 18 a 37; 36 a 55; 39 a 58; 45 a 64; 94 a 113; 196 a 215; 198 a 213; 203 a 222; 244 a 263; 330 a 349; 377 a 396; 379 a 398; 380 a 399; 398 a 417; 400 a 419; 413 a 432; 447 a 466; 460 a 479; 460 a 479; 464 a 483; 469 a 488; 474 a 493; 475 a 494; 512 a 533; 519 a 538; 551 a 570; 574 a 593; 577 a 596; 579 a 598; 590 a 609; 596 a
- 10 615; 613 a 632; 615 a 634; 616 a 635; 644 a 663; 648 a 667; 663 a 682; 674 a 693; 682 a 701; 721 a 740; 727 a 746; y 779 a 798 aminoácidos. En ciertas realizaciones, la unidad de fijación de CRKL tiene una secuencia seleccionada del grupo SEQ ID NO:78 al SEQ ID NO:123. En ciertas realizaciones, el péptido aislado puede ser definido además como un péptido cíclico.
- 15 [0040] Con la presente invención se pueden usar varios péptidos de fijación de CRKL. A continuación se proporciona una lista no limitante de péptidos de fijación de CRKL (SEQ ID: 78-123).

Tabla 1. Los Péptidos Dirigidos a Tumores Comparten Similitudes con la Integrinaβ<sub>1</sub>

| ID del Péptido | SEQ ID NO. | Péptido                           | Región Alineada | Residuo comparado                     | Puntaje |
|----------------|------------|-----------------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------|
| 1              | 78         | HTCWGARDVAQPSGTVRCLK              | 10 - 29         | HTCWGARDVAQPSGT<br>VRCLK              | 34      |
| 2              | 79         | TSCVRTGHDENLLKAYCSS               | 15 - 34         | TSCVRTGHDENLLKA<br>AYCSS              | 61      |
| 3              | 80         | VACDISAVERLPASARSCKT              | 18 - 37         | VACDISAVERLPASA<br>RSCKT              | 55      |
| 4              | 81         | GPCAATGVNPGDHGA <sup>AV</sup> CDQ | 36 - 55         | GPCAATGVNPGDHGA<br>AVCDQ              | 42      |
| 5              | 82         | LGCNKGRYWLSTRLSVSCAL              | 39 - 58         | LGCNKGRYWLSTRLS<br>VSCAL              | 41      |
| 6*             | 83         | YRCTLNSPFFWEDMTHECHA              | 45 - 64         | YRCTLNSPFFWEDMT<br>HECHA              | 40      |
| 7              | 84         | KLCYRSSAGSELRPPEK <sup>CAY</sup>  | 94 - 113        | KLCYRSSAGSELRPPE<br>EK <sup>CAY</sup> | 44      |
| 8              | 85         | VRCNEAQLQDSGTVPHPC <sup>CLR</sup> | 196 - 215       | VRCNEAQLQDSGTVPH<br>PC <sup>CLR</sup> | 36      |
| 9              | 86         | RTCEEVRNRAL <sup>EEL</sup> TNFCPY | 198 -           | RTCEEVRNRAL <sup>EEL</sup> T          | 44      |

|    |    |                                                                                                   |              |                                                                                                      |    |
|----|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    |    |                                                                                                   | 213          | <u>NFCPY</u>                                                                                         |    |
| 10 | 87 | LRCPL <sup>EV</sup> DRPNRDP <sup>A</sup> FLCSQ                                                    | 203 -<br>222 | LRCPL <sup>EV</sup> DRPNRDP <sup>A</sup><br>FLCSQ                                                    | 25 |
| 11 | 88 | NRCMPGFLDDADSAASPCGS                                                                              | 244 -<br>263 | NRCMPGFLDDADSA <sup>A</sup><br>SPCGS                                                                 | 53 |
| 12 | 89 | GNCMGLQVSELFMG <sup>P</sup> YKCRQ                                                                 | 330 -<br>349 | GNCMGLQVSELFMG <sup>P</sup><br>YKCRQ                                                                 | 32 |
| 13 | 90 | SRCHALRSQSVSTAGACIS                                                                               | 377 -<br>396 | SRCHALRSQSVST <sup>A</sup><br>GACIS                                                                  | 43 |
| 14 | 91 | RSCVN <sup>SD</sup> TGVLQ <sup>R</sup> GAP <sup>S</sup> CLF                                       | 379 -<br>398 | RSCVN <sup>SD</sup> TGVLQ <sup>R</sup> G <sup>A</sup><br>P <sup>S</sup> CLF                          | 37 |
| 15 | 92 | QHCVKGQFPFRESVTITCNS                                                                              | 380 -<br>399 | QHCVKGQFPFRES <sup>V</sup> T<br>ITCNS                                                                | 47 |
| 16 | 93 | MHCTSQT <sup>L</sup> RGT <sup>P</sup> SLAPKCS <sup>D</sup>                                        | 398 -<br>417 | MHCTSQT <sup>L</sup> RGT <sup>P</sup> SL <sup>A</sup><br>PKCS <sup>D</sup>                           | 43 |
| 17 | 94 | YSCTRLNGTGLQNP <sup>S</sup> ACDR                                                                  | 400 -<br>419 | YSCTRLNGTGLQNP <sup>S</sup><br>SACDR                                                                 | 37 |
| 18 | 95 | RG <sup>C</sup> WRD <sup>ST</sup> A <sup>WH</sup> V <sup>S</sup> Y <sup>P</sup> VECL <sup>A</sup> | 413 -<br>432 | RG <sup>C</sup> WRD <sup>ST</sup> A <sup>WH</sup> V <sup>S</sup> Y <sup>P</sup><br>VECL <sup>A</sup> | 35 |
| 19 | 96 | TL <sup>C</sup> RS <sup>L</sup> E <sup>H</sup> EVGLFK <sup>P</sup> RECP <sup>F</sup>              | 447 -        | TL <sup>C</sup> RS <sup>L</sup> E <sup>H</sup> EVGLFK <sup>P</sup>                                   | 47 |

|    |     |                                                                                                                                                      |              |                                                                                                                                                                                        |    |
|----|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    |     |                                                                                                                                                      | 466          | <u>RE</u> <u>CP</u> <u>F</u>                                                                                                                                                           |    |
| 20 | 97  | VVC <u>F</u> <u>ME</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>M</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>N</u>          | 460 -<br>479 | <u>P</u> <u>M</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>N</u><br><u>V</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u>          | 45 |
| 21 | 98  | WVCT <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>A</u> | 460 -<br>479 | <u>G</u> <u>M</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>A</u><br><u>W</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>P</u> | 35 |
| 22 | 99  | PNCDDL <u>D</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u>                 | 464 -<br>483 | <u>G</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u><br><u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>A</u> | 35 |
| 23 | 100 | PGCVSPFALS <u>A</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>I</u>                                                          | 469 -<br>488 | <u>S</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>I</u><br><u>P</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u>          | 47 |
| 24 | 101 | RGCTEA <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>O</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>N</u>                          | 469 -<br>488 | <u>H</u> <u>O</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>N</u><br><u>R</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>T</u>          | 49 |
| 25 | 102 | VFCCGSYC <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>H</u>                                          | 474 -<br>493 | <u>S</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>H</u><br><u>V</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>A</u>          | 40 |
| 26 | 103 | GDCETNNVT <u>K</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>G</u>                                                  | 475 -<br>494 | <u>R</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>G</u><br><u>G</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u>          | 41 |
| 27 | 104 | TTCNKSMSSQ <u>P</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>R</u>                                                 | 514 -<br>533 | <u>R</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>R</u><br><u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> | 53 |
| 28 | 105 | EGCSDIMNTA <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Y</u>                                                          | 519 -<br>538 | <u>G</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Y</u><br><u>E</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u>          | 68 |
| 29 | 106 | KICPVTNNMTTPSWA <u>H</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>M</u>                                                                                         | 551 -        | <u>H</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>M</u><br><u>K</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>A</u> | 42 |

|    |     |                       |              |                                         |    |
|----|-----|-----------------------|--------------|-----------------------------------------|----|
|    |     |                       | 570          |                                         |    |
|    | 107 |                       | 574 -<br>593 | <u>NNCPVEGSQONYSGA</u><br><u>TWCRA</u>  | 37 |
| 30 |     | NNCPVEGSQONYSGATWCRA  |              |                                         |    |
|    | 108 |                       | 577 -<br>596 | <u>RTCQVRSNNISPRMA</u><br><u>LACT</u>   | 32 |
| 31 |     | RTCQVRSNNISPRMALACT   |              |                                         |    |
|    | 109 |                       | 579 -<br>598 | <u>TECRGASSGSVSGAA</u><br><u>TDICRD</u> | 44 |
| 32 |     | TECRGASSGSVSGAATDCRD  |              |                                         |    |
|    | 110 |                       | 590 -<br>609 | <u>ARCREDITGFMGLGSA</u><br><u>NICTD</u> | 43 |
| 33 |     | ARCREDITGFMGLGSANICTD |              |                                         |    |
|    | 111 |                       | 590 -<br>609 | <u>NDCSAHAQPGWDEV</u><br><u>PMCNO</u>   | 34 |
| 34 |     | NDCSAHAQPGWDEVPMCNO   |              |                                         |    |
|    | 112 |                       | 596 -<br>615 | <u>TLCPPASMG LGREK</u><br><u>RLCSV</u>  | 32 |
| 35 |     | TLCPPASMG LGREKRLCSV  |              |                                         |    |
|    | 113 |                       | 613 -<br>632 | <u>REGRTVHRYPWGSP</u><br><u>ESCE</u>    | 44 |
| 36 |     | REGRTVHRYPWGSPESCE    |              |                                         |    |
|    | 114 |                       | 615 -<br>634 | <u>LGCMA SMLREFEGAT</u><br><u>HACTQ</u> | 39 |
| 37 |     | LGCMA SMLREFEGATHACTQ |              |                                         |    |
|    | 115 |                       | 616 -<br>635 | <u>DRCVLVRPEFGRGDA</u><br><u>RLCHS</u>  | 32 |
| 38 |     | DRCVLVRPEFGRGDARLCHS  |              |                                         |    |
|    | 116 |                       | 644 -        | <u>VECVMASASTDGTAA</u><br><u>HPCKP</u>  | 53 |
| 39 |     | VECVMASASTDGTAAHPCKP  |              |                                         |    |

|    |     |                      |              |                                                                                                                                                                                                                            |           |
|----|-----|----------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|    |     |                      | 663          |                                                                                                                                                                                                                            |           |
|    | 117 |                      | 648 -<br>667 | <u>D</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>R</u>                                        | 39        |
| 40 |     | DACSRLGERVDATAAGCSR  | 663 -<br>682 | <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>R</u><br><u>N</u> <u>O</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>P</u> | <u>33</u> |
| 41 | 118 | NOCSSLTYQGWKRTKDCIP  | 674 -<br>693 | <u>E</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>P</u><br><u>K</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>O</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>A</u>                                              | 34        |
| 42 | 119 | KSCGKYGLIVGQFAEHCP   | 682 -<br>701 | <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>M</u> <u>O</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>P</u><br><u>S</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>R</u>                                     | 29        |
| 43 | 120 | GTCPRQFFHMQEFWPSDCSR | 721 -<br>740 | <u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>P</u><br><u>V</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>M</u>                                     | 34        |
| 44 | 121 | PNCYSGDGEISSHIPVQCLM | 727 -<br>746 | <u>G</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>A</u><br><u>L</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>T</u>                                              | 50        |
| 45 | 122 | GYCLTVVGAVLTIALLCVT  | 779 -<br>798 | <u>I</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>P</u><br><u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>K</u>                                              | 35        |
| 46 | 123 | IGCNHPSPLGSTVPTYCFK  |              |                                                                                                                                                                                                                            |           |

## Definiciones

[0041] Una “porción de señalización” es un término que abarca varios tipos de reactivos de afinidad que pueden ser usados para mejorar la localización o fijación de una sustancia a una ubicación particular en un animal, incluyendo órganos, tejidos, tipos de células particulares, tejidos enfermos o tumores. Las porciones de señalización pueden incluir péptidos, péptido miméticos, polipéptidos, anticuerpos, moléculas tipo anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, y fragmentos de los mismos. En ciertas realizaciones, una porción de señalización mejorará la localización de una sustancia en células que expresan la CRKL extracelularmente, es decir, la CRKL es asociada con la superficie celular o asociada con la matriz extracelular que la rodea. La fijación selectiva de una porción de señalización de la presente invención, por ejemplo, un péptido de señalización, así como variantes y fragmentos del mismo es cuando la porción de señalización se fija al objetivo (por ejemplo, CRKL) y no se fija significativamente a proteínas no relacionadas. Se considera que una porción de señalización todavía se fija selectivamente incluso si también se fija a otras proteínas que no son substancialmente homólogas al objetivo siempre que dichas proteínas compartan homología con un fragmento o dominio del péptido objetivo del anticuerpo. En este caso, se entendería que la porción de señalización que se fija al objetivo aún es selectiva a pesar de existir cierto grado de reactividad cruzada. Típicamente, el grado de reactividad cruzada puede ser determinado y diferenciado a partir de la fijación al objetivo.

[0042] Un “péptido de señalización de tumores” es un péptido que comprende una unidad de fijación de CRKL, en donde dicha unidad se define como: que tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos, un grado de similitud a un mejor alineamiento de secuencia a la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos 25%; y en donde el péptido de señalización tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos y se caracteriza por la localización selectiva en un órgano, tejido o tipo de célula bajo condiciones fisiológicas, que incluyen fijación específica con una CRKL extracelular. La localización selectiva puede ser determinada, por ejemplo, mediante métodos revelados más adelante, en donde la secuencia del péptido de señalización putativo se fija a una proteína que se expone en la superficie exterior de un fago.

[0043] Un “sujeto” se refiere por lo general a un mamífero. En ciertas realizaciones preferidas, el sujeto es un ratón o conejo. En realizaciones incluso más preferidas, el sujeto es un humano.

**CRKL (virus número 10 del tumor de pollo que regula la proteína tipo quinasa)**

[0044] La leucemia mielógena crónica (CML) es un cáncer hematológico en el que ocurre una proliferación descontrolada de granulocitos. Con frecuencia se caracteriza por la traslocación recíproca de los cromosomas 9 y 22, lo que reubica al protooncogen Albeson (abl) en el extremo 3' de la región de fractura (bcr; por sus siglas en inglés). Esto produce un gen de fusión bcr-abl que codifica una proteína de fusión p210.sup.bcr-abl, que es tumorigénica y es necesaria para el crecimiento de las células de la CML (Szczylik *et al.*, 1991; Skorski *et al.*, 1994; Tari *et al.*, 1994; McGahon *et al.*, 1994; Bedi *et al.*, 1994).

[0045] La proteína bcr-abl puede auto fosforilarse en el aminoácido tirosino 177 encontrado dentro del primer exón de bcr. Cuando está fosforilado, el dominio bcr de la proteína bcr-abl se fija al dominio SH2 del factor de crecimiento de la proteína adaptadora 2 (Grb2) proteína fijada al receptor. A través del dominio SH3, el Grb2 se fija al factor de intercambio de Son of sevenless 1 humano (hSos1) GDP/GTP dando como resultado la activación de la proteína ras. La proteína bcr-abl también puede transforilar el aminoácido tirosina 177 encontrado dentro de la proteína bcr normal. Se cree que cuando la proteína bcr normal se vuelve tirosina fosforilada en el aminoácido 177, también formará complejo con Grb2. Cuando la proteína bcr-abl es expresada, las proteínas p46 y p52 Shc (Puil *et al.*, 1994) también se convierten en tirosina fosforilada. También se ha mostrado que estas proteínas Shc forman complejos estables con Grb2. Por lo tanto, Grb2 parece jugar un rol muy importante en la tumorigenicidad mediada por la proteína bcr-abl (Puil *et al.*, 1994; Pendergast *et al.*, 1993).

[0046] También se ha descubierto que la tipo Crk (CRKL), otra proteína adaptadora, se fija a bcr-abl. A diferencia de la Grb2, la CRKL se fija a bcr-abl a través de dominio abl. A través de su dominio SH3, la CRKL también puede fijarse al hSos1, lo que nuevamente lleva a la activación de la proteína Ras (ten Hoeve *et al.*, 1994a y 1994b). Así, a través de las proteínas adaptadoras Grb2 y CRKL, la proteína bcr-abl ha sido vinculada a la activación ras, lo que se sabe lleva a la tumorigénesis. Cuando se inhibe la expresión de la proteína ras, también se inhibe la proliferación de las células CML. Por lo tanto, una de las principales vías por las que la proteína bcr-abl promueve la proliferación de las células CML es activando la proteína ras (Skorski *et al.*, 1994 y 1995).

[0047] Los inventores descubrieron que se observaba una interacción específica entre la proteína de señalización intracelular CRKL y un dominio extracelular de integrina  $\beta_1$  (más que fijación al ligando) reguladora. Sorprendentemente, los inventores

descubrieron que la CRKL, convencionalmente conocida como adaptadores intracelulares, señala el dominio plexin-semaforin-integrina (PSI) de la integrina  $\beta_1$  ubicada fuera de la célula. Dispara las MAP quinasas, y promueve el crecimiento y supervivencia celular. Sin desear limitarnos a teoría alguna, estos resultados sustentan la idea de que existe una

5 función no reconocida de afuera hacia dentro mediada por la integrina para los mediadores intracelulares, tales como proteínas que contienen SH3, al activar la vía MAP quinasa.

### **Análisis del alineamiento de secuencia**

[0048] La similitud de secuencia es definida como identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos, pero no necesariamente indica que dos secuencias tienen linajes comunes. Por ejemplo, un 25% de similaridad significa que 25 posiciones de nucleótidos de

10 100 son idénticas en las dos secuencias de nucleótidos. “El mejor alineamiento de secuencias” en la presente invención se define como un análisis de secuencias usando métodos de alineamiento de secuencias conocidos para aquellos con conocimientos ordinarios del arte para encontrar los alineamientos por tramos (locales) o globales de dos o más secuencias. Como sabrá un experto en el arte, se pueden usar varios algoritmos para la

15 comparación de secuencias, por ejemplo, alineamientos BLAST, *etc.*

[0049] El alineamiento de secuencias entre péptidos de fago que se dirigen al tumor y la integrina  $\beta_1$  puede analizarse usando las técnicas aquí reveladas o como lo serán. Los inventores usaron el software Peptide Match codificado en Perl 5.8.1 basado en RELIC50. El programa calcula la similaridad en base a un tamaño de ventana de residuo

20 predefinido entre una secuencia de péptido seleccionado por afinidad y la secuencia de proteínas objetivo del terminal de proteína N- a C- en turnos de un residuo. Los puntajes de similaridad péptido-proteína para cada residuo fueron calculados en una matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 modificada para que se ajuste a una representación de aminoácido rara. Los umbrales se pueden establecer en por lo menos 4 residuos

25 idénticos entre el péptido y el segmento de proteína para discriminar las similitudes significativas de coincidencias de trasfondo no específicas.

### **Proteínas y Péptidos**

[0050] En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden por lo menos una proteína o péptido. Tal como se usa en este documento, una proteína o péptido generalmente se refiere, pero no se limita a, una

30 proteína de más de alrededor de 200 aminoácidos, hasta una secuencia complete trasladada

28

desde un gen; un polipéptido de más de alrededor de 100 aminoácidos; y/o un péptido de alrededor de 3 a alrededor de 100 aminoácidos. Por conveniencia, los términos “proteína,” “polipéptido” y “péptido” son usados aquí en forma intercambiable.

[0051] En ciertas realizaciones el tamaño de por lo menos una proteína o péptido puede comprender, pero no limitarse a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, alrededor de 110, alrededor de 120, alrededor de 130, alrededor de 140, alrededor de 150, alrededor de 160, alrededor de 170, alrededor de 180, alrededor de 190, alrededor de 200, alrededor de 210, alrededor de 220, alrededor de 230, alrededor de 240, alrededor de 250, alrededor de 275, alrededor de 300, alrededor de 325, alrededor de 350, alrededor de 375, alrededor de 400, alrededor de 425, alrededor de 450, alrededor de 475, alrededor de 500, alrededor de 525, alrededor de 550, alrededor de 575, alrededor de 600, alrededor de 625, alrededor de 650, alrededor de 675, alrededor de 700, alrededor de 725, alrededor de 750, alrededor de 775, alrededor de 800, alrededor de 825, alrededor de 850, alrededor de 875, alrededor de 900, alrededor de 925, alrededor de 950, alrededor de 975, alrededor de 1000, alrededor de 1100, alrededor de 1200, alrededor de 1300, alrededor de 1400, alrededor de 1500, alrededor de 1750, alrededor de 2000, alrededor de 2250, alrededor de 2500 o residuos de aminoácidos mayores. Por ejemplo, un péptido de señalización puede estar presente en una proteína de fusión para dar como resultado una proteína.

[0052] En algunos aspectos el tamaño de un péptido que se dirige al tumor definido en la presente invención puede comprender, pero no limitarse a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 residuos aminoácidos. En otros aspectos el tamaño de un péptido que se dirige al tumor puede comprender, pero no limitarse a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 residuos aminoácidos, o cualquier rango que se pueda derivar en ellos. En ciertas realizaciones, se pueden usar péptidos con menos de o iguales a 20 aminoácidos, o péptidos de 6-10 aminoácidos de longitud.

[0053] Tal como se usa aquí, un “residuo aminoácido” se refiere a cualquier aminoácido que ocurre naturalmente, cualquier derivado aminoácido o cualquier imitación de aminoácido conocido en el arte. En ciertas realizaciones, los residuos de la proteína o péptido son secuenciales, sin que ningún aminoácido interrumpa la secuencia de

residuos aminoácidos. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más porciones no aminoácidos. En realizaciones particulares, la secuencia de residuos de la proteína o péptido puede ser interrumpida por una o más porciones no aminoácidos.

[0054] Por consiguiente, el término “proteína o péptido” abarca secuencias de aminoácidos que comprenden por lo menos uno de 20 aminoácidos comunes encontrados en proteínas que ocurren naturalmente, o por lo menos un aminoácido modificado o inusual, incluyendo pero no limitándose a Aad, ácido 2-Aminoadípico, EtAsn, N-Etilasparagina; Baad, ácido 3- Aminoadípico, Hyl, Hidroxilisina; Bala,  $\beta$ -alanina, ácido  $\beta$ -Amino-propiónico; AHyl, allo-Hidroxilisina; Abu, ácido 2-Aminobutírico; 3Hyp, 3-Hidroxiprolina; 4Abu, ácido 4- Aminobutírico, ácido piperidínico; 4Hyp, 4-Hidroxiprolina; Acp, ácido 6-Aminocapróico, Ide, Isodesmosina; Ahe, ácido 2-Aminoheptanóico; Alle, allo-Isoleucina; Aib, ácido 2-Aminoisobutírico; MeGly, N-Metilglicina, sarcosina; Baib, ácido 3-Aminoisobutírico; Melle, N-Metilisoleucina; Apm, ácido 2-Aminopimélico; MeLys, 6-N-Metilisina; Dbu, ácido 2,4-Diaminobutírico; MeVal, N-Metilvalina; Des, Desmosina; Nva, Norvalina; Dpm, ácido 2,2'-Diaminopimélica; Nle, Norleucina; Dpr, ácido 2,3-Diaminopropiónico; Orn, Ornitina; y EtGly, N-Etilglicina.

[0055] Las proteínas o péptidos se pueden hacer mediante cualquier técnica conocida para los expertos en el arte, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas de biología molecular estándares, el aislamiento de proteínas o péptidos de fuentes naturales, o la síntesis química de proteínas o péptidos. Las secuencias nucleótido y proteína, polipéptido y péptido correspondientes a varios genes han sido reveladas previamente, y pueden encontrarse en bases de datos computarizadas conocidas por aquellos con conocimientos ordinarios en el arte. Una de dichas bases de datos son las bases de datos de Genbank y GenPept del Centro Nacional para la Información de Biotecnología ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Las regiones de codificación para los genes conocidos pueden ser amplificadas y/o expresadas usando técnicas reveladas aquí o que son conocidas por aquellos con conocimientos ordinarios en el arte. Alternativamente, varias preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos son conocidas por los expertos en el arte.

### **Proteínas de fusión**

[0056] Otras realizaciones de conjugados de proteínas se refieren a proteínas de fusión. Estas moléculas generalmente tienen todo o una parte sustancial de un péptido que se dirige al tumor fijada al terminal N- o C-, a todo o a una parte de un Segundo polipéptido

o proteína. Por ejemplo, las fusiones pueden emplear secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un huésped heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, para, por ejemplo, facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un lugar de división en o cerca de la unión de fusión facilitará la remoción del polipéptido extraño luego de la purificación. Otras fusiones útiles incluyen la fijación de dominios funcionales, tales como lugares activos de las enzimas, dominios de glicosilación, señales que se dirigen a las células o regiones transmembranas. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la presente invención comprenden un péptido de señalización LPR enlazado a una proteína o péptido terapéutico. Ejemplos de proteínas o péptidos que se pueden incorporar a una proteína de fusión incluyen proteínas citostáticas, proteínas citocidales, agentes pro-apoptosis, agentes anti-angiogénicos, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, medicamentos de péptido, anticuerpos, anticuerpos de fragmentos Fab, antígenos, proteínas receptoras, enzimas, lectinas, proteínas MHC, proteínas de adhesión celular y proteínas de fijación. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes y se contempla que dentro del alcance de la presente invención virtualmente cualquier proteína o péptido podría incorporarse a una proteína de fusión que comprende un péptido de señalización. Los métodos para generar proteínas de fusión son bien conocidos por los expertos en el arte. Dichas proteínas pueden ser producidas, por ejemplo, mediante la adhesión química usando reactivos de enlace cruzado bifuncionales, mediante la novo síntesis de la proteína de fusión completa, o mediante la adhesión de una secuencia de ADN que codifica el péptido de señalización a una secuencia de ADN que codifica el segundo péptido o proteína, seguido por la expresión de la proteína de fusión intacta.

### **Purificación de proteínas**

[0057] En ciertas realizaciones, se puede aislar o purificar una proteína o péptido. Las técnicas de purificación de proteínas son muy conocidas por los expertos en el arte. Estas técnicas suponen, en un nivel, la homogenización y fraccionamiento crudo de las células, tejido y órgano en fracciones de polipéptido o no polipéptido. La proteína o polipéptido de interés puede ser más purificada usando técnicas cromatográficas o electroforéticas para lograr una purificación parcial o completa (o purificación hasta la homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad y enfoque isoelectrico. Un ejemplo de purificación de proteína receptora por cromatografía de afinidad se revela en la Patente U.S. 5,206,347, cuyo texto completo

se incorpora aquí como referencia. Un método particularmente eficiente de purificar péptidos es la cromatografía líquida de rápida performance (FPLC) o incluso cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

[0058] Una proteína o péptido purificado pretende referirse a una composición, 5 aislable a partir de otros componentes, en donde la proteína o péptido es purificado a cualquier grado relativo al estado en que se puede obtener naturalmente. Por tanto, una proteína o péptido aislado o purificado también se refiere a una proteína o péptido libre del ambiente en el que puede ocurrir naturalmente. Generalmente, “purificado” se referirá a una composición de proteína o péptido que ha sido sometida a fraccionamiento para retirar 10 varios otros componentes, y cuya composición substancialmente retiene su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término “substancialmente purificado”, esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, como por ejemplo que constituye alrededor del 50%, alrededor del 60%, alrededor del 70%, alrededor del 80%, alrededor de 90%, 15 alrededor de 95%, o más de las proteínas en la composición.

[0059] A la luz de la presente revelación hay varios métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido conocidos para los expertos en el arte. Estos incluyen, por ejemplo, una fracción por análisis SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, 20 compararla con la actividad específica del extracto inicial, y así calcular el grado de pureza en ellos, evaluada por un “número de purificación -veces.” Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad, dependerán, por supuesto, de si la proteína o péptido expresado exhibe o no una actividad detectable.

[0060] Los expertos en el arte conocen bien varias técnicas adecuadas para usarlas 25 en la purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o mediante la desnaturalización por calor, seguida de: centrifugación, pasos de cromatografía tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxilapatita y cromatografía de afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel, y combinaciones de éstas u otras técnicas. Tal como se conoce 30 generalmente en el arte, se cree que el orden de la realización de los varios pasos de purificación puede ser cambiado, o que ciertos pasos pueden ser omitidos, y aún así sería un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido substancialmente purificado.

[0061] No hay un requisito general de que la proteína o péptido siempre sea provista en su estado más purificado. En efecto, se contempla que productos menos purificados substancialmente tendrán utilidad en ciertas realizaciones. La purificación parcial puede lograrse usando menos pasos de purificación en combinación con, o  
 5 utilizando diferentes formas del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente dará como resultado una mayor purificación de “-veces” que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que presentan un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la  
 10 recuperación total del producto de proteína, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

[0062] La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que será aislada y una molécula a la que se puede fijar específicamente. Este es un tipo de interacción receptor-ligando. El material  
 15 de la columna es sintetizado mediante la unión covalente de uno de los ligandos a una matriz insoluble. El material de la columna es entonces capaz de absorber específicamente la sustancia de la solución. La levigación ocurre cambiando las condiciones a aquellas en las que no ocurrirá la fijación (*p. Ej.*, pH alterado, fuerza iónica, temperatura, *etc.*). La matriz debería ser una sustancia que en sí misma no absorbe moléculas en una medida  
 20 significativa y que tiene un amplio rango de estabilidad química, física y térmica. El ligando debería ser unido de tal manera que no afecte las propiedades de fijación. El ligando también debería proporcionar una fijación relativamente fuerte. Y debería ser posible levigar la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

### **Péptidos Sintéticos**

[0063] Debido a su tamaño relativamente pequeño, los péptidos de señalización de  
 25 la invención pueden ser sintetizados en solución o en soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Hay varios sintetizadores automáticos comercialmente disponibles y pueden ser usados de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, 1984; Tam *et al.*, 1983; Merrifield, 1986; Barany y Merrifield, 1979, incluidos aquí como referencia. Las secuencias de péptidos cortas, generalmente de  
 30 alrededor de 6 hasta alrededor de 35 a 50 aminoácidos, pueden ser sintetizadas fácilmente usando dichos métodos. Alternativamente, se puede emplear la tecnología de ADN recombinante en donde una secuencia de nucleótido que codifica un péptido de la invención es insertado en un vector de expresión, transformado o transfectado a una célula huésped apropiada, y cultivado bajo condiciones adecuadas para la expresión.

## Conjugados Terapéuticos o de Diagnóstico

[0064] Las porciones de señalización identificadas usando estos métodos pueden ser unidos o adheridos a varias sustancias, incluyendo agentes terapéuticos o de diagnóstico, para una administración selectiva del conjugado a un órgano, tejido o tipo de célula deseado en un sistema de modelo ratón. Las realizaciones de la invención están dirigidas al tratamiento de una enfermedad o trastorno, preferiblemente un cáncer. El péptido de señalización de tumores de la presente invención puede ser adherido a una molécula; por ejemplo, la molécula puede ser una proteína y el péptido puede estar conjugado o fusionado a la proteína para formar un conjugado de proteína, en donde el conjugado de proteína no es una proteína que ocurre naturalmente. El péptido puede estar posicionado en un terminal de la proteína. Dicha molécula puede ser un agente de pro-apoptosis, un agente anti-angiogénico, una citocina, un agente citotóxico, un medicamento, un agente quimioterapéutico, una hormona, un factor de crecimiento, un antibiótico, un anticuerpo o fragmento o cadena simple del mismo, un factor de supervivencia, un agente anti-apoptótico, un antagonista de hormonas, un antígeno, un péptido, una proteína, un agente de diagnóstico, un radioisótopo, o un agente de imágenes.

[0065] El péptido de señalización de tumores puede ser adherido a un complejo macromolecular, como por ejemplo un virus, un bacteriófago, una bacteria, un liposoma, una micropartícula, una perla magnética, una célula de levadura, o una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, dicho péptido está adherido a un virus, como por ejemplo un lentivirus, papovavirus, adenovirus, retrovirus, AAV, vaccinia virus o virus del herpes. Dicho péptido puede estar adherido a un soporte sólido, tal como una placa con múltiples pocillos o microchip.

### A. Reguladores de la Muerte Celular Programada

[0066] La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal, el mantenimiento de la homeostatis en tejidos adultos, y para la supresión de la carcinogenesis (Kerr *et al.*, 1972). Se ha demostrado que la familia de proteínas Bcl-2 y las proteasas tipo ICE son importantes reguladores y efectores de apoptosis en otros sistemas. La proteína Bcl-2, descubierta en asociación con el linfoma folicular, juega un importante papel en el control de la apoptosis y en el mejoramiento de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). La proteína Bcl-2 conservada evolucionariamente es reconocida ahora como un miembro de una familia de proteínas relacionadas, las cuales pueden ser categorizadas como agonistas de la muerte o antagonistas de la muerte.

[0067] Luego de su descubrimiento, se mostró que la Bcl-2 actúa para suprimir la muerte celular disparada por una variedad de estímulos. Así mismo, ahora es aparente que existe una familia de proteínas reguladoras de la muerte celular Bcl-2 que comparten homologías estructurales y de secuencia comunes. Se ha mostrado que estos diferentes miembros de la familia poseen funciones similares a la Bcl-2 (*e.g.*, Bcl<sub>XL</sub>, Bcl<sub>w</sub>, Bcl<sub>s</sub>, Mcl-1, A1, Bfl-1) o contrarrestan la función de la Bcl-2 y promueve la muerte celular (*e.g.*, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

[0068] Ejemplos de agente pro-apoptosis son gramicidina; magainina; melitina; defensina; cecropina; (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70); (KLAKKLA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:71); (KAAKKAA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:72); (KLGKKLG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:73); Bcl-2; Bad; Bak; Bax; y Bik. En ciertas realizaciones, dicho agente pro-apoptosis es (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70). SEQ ID NO:70 puede consistir de aminoácidos D.

### **B. Inhibidores Angiogénicos**

[0069] La proliferación de células tumorales depende en gran parte de la vascularización extensiva del tumor, lo que acompaña la progresión del cáncer. Así, la inhibición de la formación de vasos sanguíneos con agentes anti-angiogénicos y la destrucción de los vasos sanguíneos existentes han sido presentadas como un enfoque eficaz y relativamente no tóxico para el tratamiento de tumores. (Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 1998; Ellerby *et al.*, 1999). Se conoce una variedad de agentes anti-angiogénicos y/o inhibidores de vasos sanguíneos (*e.g.*, Folkman, 1997; Eliceiri y Cheresch, 2001).

[0070] En ciertas realizaciones de la presente invención se puede utilizar la administración de porciones de señalización operativamente unidas a agentes anti-angiogénicos, tales como una trombospondina, una angiostatina, factor de pigmentación derivado del epitelio, angiotensina, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador del plasminogen, inhibidores de la metaloproteinasa de los tejidos, interferones, interleucina 12, factor plaquetario 4, IP-10, Gro-β, trombospondina, 2-metoxioestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazole, CM101, Marimastat, polisulfato de pentosan, angiopoietina 2, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, Docetaxel, poliaminas, un inhibidor de la proteasoma inhibidor, un inhibidor de quinasas, un péptido de señalización, accutin, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4, minociclina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio hemopexin del terminal C- de la matriz metaloproteinasa-2, el dominio kringle 5 del plasminogen humano, una proteína de endostatina y angiostatina, una proteína de fusión

de endostatina y el dominio kringle 5 del plasminogen humano, el interferón gamma inducido por monocina (Mig), una proteína de fusión de Mig y IP10, FLT-1 soluble (receptor de tironina quinasa 1 tipo aletas), o receptor de dominio de inserto quinasa (KDR). Dicha molécula puede ser una citocina seleccionada del grupo que consiste de interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferón- $\gamma$  (IF- $\gamma$ ), IF- $\alpha$ , IF- $\beta$ , un factor de necrosis tumoral, o GM-CSF (factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos).

### C. *Agentes Citotóxicos*

[0071] Los agentes quimioterapéuticos (citotóxicos) pueden ser unidos a un péptido de señalización de la presente invención y usados para tratar varios estados de enfermedades hiperproliferativas o neoplásicas, incluyendo cáncer. Los agentes quimioterapéuticos (citotóxicos) de uso potencial incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracil, bleomicina, busulfan, camptotecina, carboplatina, clorambucil, cisplatina (CDDP), ciclofosfamida, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, agentes de fijación del receptor estrógeno, etoposida (VP16), inhibidores de transferasa de farnesil-proteína, gemcitabina, ifosfamida, mecloretamina, melfalan, mitomicina, navelbina, nitrosurea, plicomicina, procarbazona, raloxifeno, tamoxifen, taxol, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, vinblastina y metotrexato, vincristina, o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores. La mayoría de agentes quimioterapéuticos caen en las categorías de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, hormonas corticosteroides, inhibidores mitóticos, y nitrosoureas, agentes hormonales, agentes varios, y cualquier análogo o variante derivada de los mismos.

[0072] Los agentes quimioterapéuticos y métodos de administración, dosificación, etc., son bien conocidos por los expertos en el arte (véase por ejemplo, el "Physicians Desk Reference", Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" ("La Base Farmacológica de la Terapéutica") y en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15<sup>a</sup> ed., pp 1035-1038 y 1570-1580, incluidos aquí como referencia en sus partes relevantes), y pueden ser combinados con la invención a la luz de las revelaciones del presente documento. Necesariamente ocurrirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier evento, la dosis apropiada para el sujeto individual. Por supuesto, todas las dosificaciones y agentes aquí descritos son ejemplos más que limitaciones, y los expertos en el arte pueden usar otras dosificaciones y agentes para un paciente o aplicación específica. También se espera que se use cualquier dosificación entre estos puntos, o rango derivado de los mismos en la invención.

#### **D. Agentes alquilantes**

[0073] Los agentes alquilantes son drogas que interactúan directamente con el ADN genómico para evitar que las células proliferen. Esta categoría de drogas quimioterapéuticas representa agentes que afectan a todas las fases del ciclo celular, es decir, que no son específicas para una fase. Un agente alquilante puede incluir, pero no se limita a, mostaza de nitrógeno, una etilenimina, una metilmelamina, un sulfonato de alquilo, una nitrosourea o triazinas. Incluyen pero no se limitan a: busulfan, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida (citoxan), dacarbazina, ifosfamida, mecloretamina (mustargen), y melfalan.

#### **E. Antimetabolitos**

[0074] Los antimetabolitos perturban la síntesis del ADN y ARN. A diferencia de los agentes alquilantes, específicamente influyen en el ciclo celular durante la fase S. Los antimetabolitos pueden ser diferenciados en varias categorías, tales como análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina y análogos de purina y compuestos inhibitorios relacionados. Los antimetabolitos incluyen pero no se limitan a, 5-fluorouracil (5-FU), citarabina (Ara-C), fludarabina, gemcitabina, y metotrexato.

#### **F. Productos Naturales**

[0075] Los productos naturales generalmente se refieren a compuestos originalmente aislados de una fuente natural, e identificados como que tienen una actividad farmacológica. Dichos compuestos, análogos y derivados de los mismos, pueden ser aislados a partir de una fuente natural, sintetizados químicamente o producidos de forma recombinada mediante cualquier técnica a conocida por los expertos en el arte. Los productos naturales incluyen categorías como inhibidores mitóticos, antibióticos antitumorales, enzimas y modificadores de respuesta biológica.

[0076] Los inhibidores mitóticos incluyen alcaloides de plantas y otros agentes naturales que pueden inhibir ya sea la síntesis de proteínas requeridas para la división celular o la mitosis. Funcionan durante una fase específica durante el ciclo celular. Los inhibidores mitóticos incluyen, por ejemplo, docetaxel, etoposida (VP16), teniposida, paclitaxel, taxol, vinblastina, vincristina, y vinorelbina.

[0077] Los taxoides son una clase de compuestos relacionados aislados de la corteza del fresno, *Taxus brevifolia*. Los taxoides incluyen pero no se limitan a compuestos tales como docetaxel y paclitaxel. El paclitaxel se fija a la tubulina (en un lugar distinto al usado por los alcaloides de la vinca) y promueve la instalación de microtúbulos.

[0078] Los alcaloides de la vinca son un tipo de planta alcaloide identificada como que tiene actividad farmacéutica. Incluyen compuestos como vinblastina (VLB) y vincristina.

#### **G. Antibióticos**

[0079] Ciertos antibióticos tienen actividad tanto antimicrobica como citotóxica. 5 Estas drogas también interfieren con el ADN inhibiendo químicamente las enzimas y la mitosis o alternando las membranas celulares. Estos agentes no son específicos de una fase por lo que funcionan en todas las fases del ciclo celular. Ejemplos de antibióticos citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina (Adriamicina), plicamicina (mitramicina) e idarubicina.

#### **H. Agentes Citotóxicos Varios**

10 [0080] Los agentes citotóxicos varios que no caen en las categorías anteriores incluyen, pero no se limitan a, complejos de coordinación de platino, antracenedionas, ureas substituidas, derivados de metil hidrazina, amsacrina, L-asparaginasa, y tretinoína. Los complejos de coordinación de platino incluyen compuestos tales como carboplatin y cisplatin (*cis*-DDP). Un ejemplo de antracenediona es mitoxantrona. Un ejemplo de urea 15 substituida es hidroxiurea. Un ejemplo de derivado de metil hidracina es procarbazona (N-metilhidrazina, MIH). Estos ejemplos no son limitantes y se contempla que cualquier agente citotóxico, citostático o citocidal puede ser adherido a péptidos de señalización y administrados a un órgano objetivo, tejido o tipo de célula dentro del alcance de la invención.

#### **I. Agentes de imágenes y radioisótopos**

20 [0081] En ciertas realizaciones, las porciones de señalización de la presente invención pueden ser adheridos a agentes de imágenes usados para la toma de imágenes y el diagnóstico de varios órganos, tejidos o tipos de células enfermas. En el arte se conocen muchos agentes de imágenes apropiados, así como los métodos para adherirlos a proteínas o péptidos (véase, *p. Ej.*, las Patentes U.S. 5,021,236 y 4,472,509, ambas incluidas aquí 25 como referencia. Ciertos métodos de adhesión suponen el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como un DTPA adherido a la proteína o péptido (Patente U.S. 4,472,509). Las proteínas y péptidos también pueden ser reaccionadas con una enzima en presencia de un agente de adherencia tal como glutaraldehído o periodato. Los conjugados con marcadores de fluoroceína son preparados 30 en presencia de estos agentes de adhesión o por reacción con un isotiocianato.

[0082] Ejemplos no limitantes de iones paramagnéticos de uso potencial como agentes de imágenes incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III), prefiriéndose particularmente el gadolinio. Los útiles en otros contextos, tales como imágenes de rayos X, incluyen, pero no se limitan a lantano (III), oro (III), plomo (II), y especialmente bismuto (III).

[0083] Los radioisótopos de uso potencial como agentes de imágenes o terapéuticos incluyen astatina<sup>211</sup>, <sup>14</sup>carbono, <sup>51</sup>cromo, <sup>36</sup>cloro, <sup>57</sup>cobalto, <sup>58</sup>cobalto, cobre<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, galio<sup>67</sup>, <sup>3</sup>hidrógeno, yodo<sup>123</sup>, yodo<sup>125</sup>, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, <sup>59</sup>hierro, <sup>32</sup>fósforo, renio<sup>186</sup>, renio<sup>188</sup>, <sup>75</sup>selenio <sup>35</sup>azufre, tecnicio<sup>99m</sup> e itrio<sup>90</sup>. Con frecuencia se prefiere el <sup>125</sup>I para usarlo en ciertas realizaciones, y con frecuencia también se prefieren el tecnicio<sup>99m</sup> y el indio<sup>111</sup> debido a su baja energía y conveniencia para la detección de largo alcance.

[0084] Las proteínas o péptidos radioactivamente marcados de la presente invención pueden ser producidas de acuerdo con métodos muy conocidos en el arte. Por ejemplo, pueden ser yodados por contacto con yoduro de sodio o de potasio y un agente oxidante químico como por ejemplo hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático como lactoperoxidasa. Las proteínas o péptidos de acuerdo con la invención pueden ser marcadas con tecnicio-<sup>99m</sup> por proceso de intercambio de ligandos, por ejemplo, reduciendo pertecnato con solución de estaño, quelando el tecnicio reducido en una columna de Sephadex y aplicando el péptido a esta columna o por técnicas de marcación directa, *p. Ej.*, incubando pertecnato, un agente reductor como por ejemplo  $\text{SnCl}_2$ , una solución amortiguadora como solución de ftalato de sodio-potasio, y el péptido. Los grupos funcionales intermediarios que con frecuencia se usan para fijar los radioisótopos que existen como iones metálicos a péptidos son ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). También se contemplan para su uso los marcadores fluorescentes, incluyendo rodamina, isotiocianato de fluoresceína y renografina.

[0085] En ciertas realizaciones, las proteínas o péptidos reivindicados pueden enlazarse a un ligando de fijación secundario o a una enzima (una etiqueta de enzima) que generará un producto coloreado al contacto con un substrato cromogénico. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, (rábano picante) peroxidasa de hidrógeno y oxidasa de glucosa. Los ligandos de fijación secundarios preferidos son biotina y avidina o compuestos de estreptavidina. El uso de dichos marcadores es muy conocido

para los expertos en el arte a la luz de y como se describe en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241; incorporadas aquí como referencia.

[0086] En otras realizaciones, una porción de señalización puede ser operativamente adherido a una nanopartícula. Las nanopartículas incluyen, pero no se limitan a nanopartículas coloidales de oro y plata. Las nanopartículas metálicas presentan colores en la región espectral visible. Se cree que esos colores son el resultado de la excitación de las resonancias de plasmón superficial en las partículas metálicas y son extremadamente sensible a los tamaños, formas y estado de agregación de las partículas; las propiedades dieléctricas del medio que las rodea; la absorción de iones en la superficie de las partículas (Para ver ejemplos véase la Solicitud de Patente Estadounidense 20040023415, que se incluye aquí como referencia).

#### ***J. Reticulantes***

[0087] También se pueden incluir reticulantes en una proteína de fusión u otro constructo que comprende un péptido de señalización de la CRKL; por ejemplo, los reticulantes pueden ser útiles para conjugar un péptido de señalización a un liposoma o a un compuesto terapéutico. Los reactivos reticulantes bifuncionales han sido ampliamente usados para una variedad de propósitos incluyendo la preparación de matrices de afinidad, modificación y estabilización de diversas estructuras, identificación ligares de fijación de ligandos y receptores, y estudios estructurales. Los reactivos homobifuncionales que llevan dos grupos funcionales idénticos probaron ser altamente eficaces en la inducción de reticulación entre macromoléculas idénticas y diferentes o subunidades de una macromolécula, en el enlace de ligandos polipéptidos a sus lugares de fijación específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Aprovechando las reactividades diferenciales de dos grupos funcionales diferentes, la reticulación puede ser controlada tanto selectiva como secuencialmente. Los reactivos de reticulación bifuncional pueden ser divididos de acuerdo con la especificidad de sus grupos funcionales, *p. Ej.*, grupos específicos amino, sulfhidrilo, guanidino, indole, carboxilo. De estos, los reactivos dirigidos a grupos amino libres se han vuelto especialmente populares debido a su disponibilidad comercial, facilidad de síntesis y condiciones de reacción moderada bajo las que se pueden aplicar. Una mayoría de reactivos reticulantes heterobifuncionales contiene un grupo amino-reactivo primario y un grupo tiol-reactivo.

[0088] Ejemplos de métodos para reticular ligandos a liposomas son descritos en las Patentes Estadounidenses 5,603,872 y 5,401,511, cada una incluida aquí en su totalidad

específicamente como referencia. Varios ligandos pueden ser fijados covalentemente a superficies liposomales a través de la reticulación de residuos amina. Los liposomas, en particular, vesículas multilaminares (MLV) o vesículas unilaminares tales como liposomas microemulsificados (MEL) y liposomas unilaminares grandes (LUVET), que contienen fosfatidiletanolamina (PE), han sido preparados mediante procedimientos establecidos. La inclusión de PE en los liposomas proporciona un residuo funcional activa, una mina primaria, en la superficie liposomal para propósitos de reticulación. Los ligandos tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF) han sido exitosamente enlazados con liposomas-PE. Los ligandos están fijados covalentemente a lugares discretos en las superficies de los liposomas. El número y densidad superficial de estos lugares son dictados por la formulación del liposoma y el tipo de liposoma. Las superficies liposómicas también pueden tener lugares para asociación no covalente. Para formar conjugados covalentes de ligandos y liposomas, se han estudiado los reactivos de reticulación para ver su eficacia y biocompatibilidad. Los reactivos reticulantes incluyen glutaraldehído (GAD), oxirano bifuncional (OXR), etilenglicoldiglicidiléter (EGDE), y una carbodiimida soluble en agua, preferentemente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). A través de la compleja química de la reticulación, se establece el enlace de los residuos amina de la sustancia de reconocimiento y liposomas.

[0089] En otro ejemplo, se describen los reactivos de reticulación heterobifuncionales y métodos para usar los reactivos de reticulación (Patente U.S. 5,889,155, específicamente incluida aquí como referencia en su totalidad). Los reactivos de reticulación combinan un residuo hidrazida nucleofílica con un residuo maleimida electrofílica, permitiendo la adherencia en un ejemplo, de aldehídos a tioles libres. El reactivo reticulante puede ser modificado para reticular varios grupos funcionales.

### Ácidos Nucléicos

[0090] De acuerdo con la presente invención los ácidos nucleicos pueden codificar un péptido, un anticuerpo de señalización, un polipéptido terapéutico, una proteína de fusión y otra proteína o péptido. El ácido nucleico puede derivarse del ADN genómico, ADN complementario (ADNc) o ADN sintético.

[0091] Un "ácido nucleico" tal como se usa aquí incluye moléculas de una sola fila o de doble fila, así como ADN, ARN, ácidos nucleicos químicamente modificados y análogos de ácidos nucleicos. Se contempla que un ácido nucleico dentro del alcance de la

presente invención puede ser casi de cualquier tamaño, determinado en parte por el largo de la proteína o péptido codificado.

[0092] Se contempla que los péptidos de señalización y proteínas de fusión pueden ser codificadas por cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia aminoácido apropiada. El diseño y producción de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácido deseada es bien conocida por los expertos en el arte, usando tablas de condones estandarizadas. En realizaciones preferidas, los condones seleccionados para codificar cada aminoácido pueden ser modificados para optimizar la expresión del ácido nucleico en la célula huésped de interés.

#### **Administración Dirigida de Vectores de Terapia Génica**

[0093] Los péptidos de señalización pueden, en ciertas realizaciones, ser adheridos a un vector de terapia génica para señalar selectiva o preferencialmente células que expresan la CRKL en la superficie celular, como ciertas células tumorales. Existen varias formas en las que los vectores de terapia génica pueden ser introducidos en las células. En ciertas realizaciones de la invención, el vector de terapia génica comprende un virus. La capacidad de ciertos virus de entrar en las células a través de endocitosis mediada por receptores, para integrarse en el genoma de la célula huésped o para ser mantenida en forma episomal, y expresar los genes virales en forma estable y eficiente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños a células de mamíferos (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubinstein, 1988.; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los vectores de terapia génica preferidos son generalmente vectores virales. Los virus ADN usados como vectores de terapia génica incluyen los papovavirus (*p. Ej.*, virus del simio 40, virus del papiloma bovino, y polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986).

[0094] Uno de los métodos preferidos para la administración *in vivo* involucra el uso de un vector de expresión del adenovirus. Aunque se sabe que los vectores del adenovirus tienen poca capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica es contrabalanceada por la alta eficacia de la transferencia génica que brindan estos vectores. "Vector de expresión del adenovirus" incluye, pero no se limita a, constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetado del constructo y (b) para expresar un polinucleótido antisentido o de sentido que ha sido clonado dentro del mismo.

[0095] Los vectores de adenovirus han sido usados en la expresión del gen eucariótico (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) y en el desarrollo de vacunas

(Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1991). Los estudios de la administración de adenovirus recombinado a diferentes tejidos incluyen instilación tráquea (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), inyección intramuscular (Ragot *et al.*, 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) e inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

[0096] En realizaciones preferidas, se pueden obtener ciertas ventajas de la adhesión de moléculas o sustancias terapéuticas a los péptidos de señalización de tumores que señalan las células que expresan y llevan la CRKL en la superficie, tales como células tumorales. Específicamente, las porciones que se dirigen a la vasculatura del tumor han sido adheridas a drogas citotóxicas o péptidos proapoptóticos para producir compuestos que fueron más eficaces y menos tóxicos que los compuestos parentales en modelos experimentales de ratones con xenoinjertos de tumor (Arap *et al.*, 1998; Ellerby *et al.*, 1999). La inserción del péptido RGD-4C en una proteína superficial de un adenovirus ha producido un vector adenoviral que puede ser usado para terapia génica dirigida a tumores (Arap *et al.*, 1998).

[0097] La unidad de péptido permite señalar las células, por ejemplo, comprendiendo una porción de señalización de la invención, y/o un ligando para un lugar de fijación en la superficie de la célula. La unidad de péptido opcionalmente puede comprender otros elementos que se usan en la señalización de células (*p. Ej.*, una secuencia de anticuerpo de cadena simple). La unidad de fijación del péptido puede ser generada mediante la inserción, y puede comprender, por ejemplo, secuencias nativas y no nativas, o pueden ser hechas completamente por secuencias no nativas. La unidad de péptido que resulta de la inserción de una secuencia de aminoácido no nativo en la proteína de fibra quimética puede ser un péptido de alta afinidad (*i.e.*, uno que fija su lugar de fijación cognado, *p. Ej.*, CRKL, cuando se proporciona en una concentración relativamente baja) o un péptido de baja afinidad (*i.e.*, uno que fija su lugar de fijación cognado, *p. Ej.*, CRKL, cuando se proporciona en una concentración relativamente alta). Preferiblemente, sin embargo, la unidad de péptido resultante, particularmente una que tiene una afinidad alta con su lugar de fijación cognado debido a su restricción dentro de la proteína de fibra de adenovirus.

[0098] Otros vectores de transferencia génica pueden ser contruidos a partir de retrovirus. (Coffin, 1990.) Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucléico que codifica una proteína de interés en un genoma viral en el lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Para producir viriones, se

construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes *gag*, *pol*, y *env*, pero sin las LTR y componentes de empaquetamiento (Mann *et al.*, 1993). Cuando un plásmido recombinado que contienen un ADNc, junto con LTR retro virales y secuencias de empaquetamiento es introducido en esta línea celular (por precipitación de fosfato de calcio por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite la transcripción del plásmido recombinado para empaquetarlo en las partículas virales, las cuales son luego secretadas en los medios de cultivo (Nicolas y Rubinstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). Luego los medios que contienen los retrovirus recombinados son recolectados, opcionalmente concentrados, y usados para la transferencia génica. Los vectores retro virales son capaces de infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind *et al.*, 1975).

[0099] Se pueden emplear otros vectores virales como vectores de terapia génica señalados. Se pueden usar vectores derivados de virus tales como vaccinia virus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986), virus adeno-asociados (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984), y virus del herpes.

[00100] En otra realización de la invención, el constructo de terapia génica puede estar entrampado en un liposoma. La administración de ácido nucléico mediado por liposomas y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha tenido mucho éxito. Wong *et al.*, (1980) demostraron la factibilidad de la administración mediada por liposomas y la expresión del ADN extraño en embriones de pollo cultivados, HeLa, y células de hepatoma. Nicolau *et al.*, (1987.) lograron una transferencia génica exitosa mediada por liposomas en ratas luego de la inyección intravenosa.

[00101] Los vectores de terapia génica de la invención pueden comprender varios transgenes, los cuales son típicamente ADN o ARN codificado de un vector de expresión. La terapia génica puede ser usada para la expresión de un gen terapéutico, expresión de VEGFR-1/NRP-1 para mejorar la neo-vascularización o para la inhibición de la expresión VEGFR-1/NRP-1 para el tratamiento de estados de enfermedad asociados a la neo-vascularización. El ADN puede tener la forma de ADNc, ADN polimerizado *in vitro*, ADN de plásmido, partes de un ADN de plásmido, material genético derivado de un virus, ADN lineal, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), cassettes de expresión, secuencias quiméricas, ADN recombinado, ADN cromosómico, un oligonucleótido, ADN anti-sentido, o derivados de estos grupos. El ARN puede tener la forma de ARN de oligonucleótido, ARNt (ARN de transferencia), ARNsn (ARN nuclear

pequeño), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN polimerizado *in vitro*, ARN recombinado, secuencias quiméricas, ARN anti-sentido, ARNsi (ARN de interferencia pequeña), ribozimas, o derivados de estos grupos. Un polinucleótido anti-sentido es un polinucleótido que interfiere con la función del ADN y/o ARN. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a: morfolinós, 2'-O-metil polinucleótidos, ADN, ARN y similares. El ARNsi comprende una estructura de dos filas que típicamente contiene de 15-50 pares base y preferiblemente de 21-25 pares base y que tiene una secuencia nucleótida idéntica o casi idéntica a un gen señalizado expresado o ARN dentro de la célula. La interferencia puede dar como resultado la supresión de la expresión. Además, el ADN y el ARN pueden ser simples, dobles, triples o cuádruples.

### **Composiciones Farmacéuticas**

[00102] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad efectiva de uno o más de dichos péptidos de señalización de tumores o agente adicional disuelto o dispersado en un portador farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o desfavorable cuando se administra a un animal, como por ejemplo, un humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene por lo menos un péptido de señalización de tumores de la presente invención o ingrediente activo adicional serán conocidos por los expertos en el arte a la luz de la presente revelación, tal como se ejemplifica en Ciencias Farmacéuticas de Remington, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990, incluida aquí como referencia. Además, para la administración a animales (*p. Ej.*, humano), se entenderá que las preparaciones deberían cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como lo exige la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

[00103] Tal como se usa aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (*p. Ej.*, agentes antibacteriales, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, drogas, estabilizadores de drogas, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes endulzantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como lo sabrá uno con conocimientos ordinarios del arte (véase, por ejemplo, Ciencias Farmacéuticas de Remington, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, incluida aquí como referencia). Excepto

hasta donde cualquier portador convencional es incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

[00104] Las composiciones pueden comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se administrará en forma sólida, líquida o aerosol, y si  
5 necesita ser estéril para las vías de administración como inyecciones. La presente invención puede ser administrada en forma intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, tópica, intramuscular, subcutánea, mucosal, oral, tópica, local, por inhalación (*p. Ej.*, inhalación de aerosoles), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando las células objetivo directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, en  
10 cremas, en composiciones lípidas (*p. Ej.*, liposomas), o a través de cualquier otro método o cualquier combinación de los anteriores tal como lo saben aquellos con conocimientos ordinarios del arte (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21a Ed. Mack Printing Company, 2005, incluida aquí como referencia).

[00105] Además, de acuerdo con la presente invención, la composición de la  
15 presente invención adecuada para su administración es provista en un portador farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El portador debería ser asimilable e incluye portadores líquidos, semi-sólidos, *i.e.*, pastas, o sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional, agente, diluyente o portador sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de una composición contenida en el mismo, su  
20 uso en composiciones administrables para usarlas en la práctica de los métodos de la presente invención es apropiada. Los ejemplos de portadores o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos y similares, o combinaciones de los mismos. Las composiciones también pueden comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente,  
25 se puede prevenir la acción de microorganismos a través de conservantes tales como varios agentes antibacteriales y antifúngicos, incluyendo pero sin limitarse a parabenos (*p. Ej.*, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

[00106] De acuerdo con la presente invención, la composición es combinada  
30 con el portador de cualquier forma conveniente y práctica, es decir, mediante una solución, suspensión, emulsificación, agregado coloidal, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son de rutina para los expertos en el arte.

### Terapias de Combinación

[00107] Para aumentar la eficacia de un péptido de señalización de tumores que contiene una unidad de fijación de CRKL, puede ser deseable combinar estas composiciones con otros agentes o métodos de terapia, tales como agentes anticancerígenos. Un agente “anti-cáncer” es capaz de afectar negativamente el cáncer en un sujeto, por ejemplo, matando las células cancerígenas, induciendo la apoptosis en las células cancerígenas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerígenas, reduciendo la incidencia o número de metástasis, reduciendo el tamaño de los tumores, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el suministro de sangre a un tumor o a las células cancerígenas, promoviendo una respuesta inmune contra las células cancerígenas o un tumor, evitando o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando el tiempo de vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones serían provistas en una cantidad combinada efectiva para matar o inhibir la proliferación celular. Este proceso puede involucrar contactar las células con el constructo de expresión y el(los) agente(s) o factor(es) múltiple(s) a la misma vez. Esto puede lograrse poniendo a la célula en contacto con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo a la célula en contacto con dos composiciones o formulaciones diferentes, al mismo tiempo, en donde una composición incluye el constructo de expresión y el otro incluye el segundo agente(s).

[00108] La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un importante problema en la oncología clínica. Un objetivo de la investigación actual sobre el cáncer es buscar formas de mejorar la eficacia de la quimio y radioterapia combinándola con la terapia génica. Por ejemplo, cuando el gen simplex-timidina quinasa del herpes (HS-tK), se administra a tumores cerebrales mediante un sistema de vector retroviral, inducía exitosamente la susceptibilidad del agente antiviral ganciclovir (Culver, *et al.*, 1992). En el contexto de la presente invención, se contempla que el péptido de señalización de tumores podría usarse de manera similar en conjunto con una intervención quimioterapéutica, radioterapéutica, o inmunoterapéutica, además de otros agentes pro-apoptóticos o reguladores del ciclo celular.

[00109] Alternativamente, la terapia génica puede preceder o seguir al otro tratamiento con agentes a través de intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en donde el otro agente y constructo de expresión son aplicados a la célula en forma separada, uno generalmente aseguraría que un periodo de tiempo significativo no expirara entre el momento de cada administración, de manera que el agente y constructo de expresión aún serían capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En esos casos, se contempla que uno puede poner a la célula en contacto con ambas

modalidades dentro de un periodo de alrededor de 12-24 horas entre sí, más preferiblemente, dentro de alrededor de 6-12 h entre sí. Sin embargo, en algunas situaciones, puede ser deseable extender significativamente el periodo de tiempo del tratamiento, en donde pasan varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8) entre las respectivas administraciones.

[00110] Se pueden emplear varias combinaciones, en donde el péptido de señalización de tumores es “A” y el agente secundario, tal como radio o quimioterapia es “B”.

|         |         |         |         |         |         |         |         |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A/B/A   | B/A/B   | B/B/A   | A/A/B   | A/B/B   | B/A/A   | A/B/B/B | B/A/B/B |
| B/B/B/A | B/B/A/B | A/A/B/B | A/B/A/B | A/B/B/A | B/B/A/A |         |         |
| B/A/B/A | B/A/A/B | A/A/A/B | B/A/A/A | A/B/A/A | A/A/B/A |         |         |

[00111] La administración de los constructos de expresión terapéuticos de la presente invención a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de quimioterapias, tomando en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del vector. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que se pueden aplicar varias terapias estándar, así como intervenciones quirúrgicas, en combinación con la terapia celular hiperproliferativa descrita.

a. Quimioterapia

[00112] Las terapias contra el cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación tanto con tratamientos a base de químicos como a base de radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, cisplatina (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucil, busulfan, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifen, raloxifeno, agentes de fijación del receptor estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de transferasa de farnesil-proteína, transplatino, 5-fluorouracil, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores.

b. Radioterapia

[00113] Otros factores que causan daño al ADN y que han sido usados ampliamente incluyen los que comúnmente se conocen como rayos-γ, rayos-X, y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan

otras formas de factores que dañan el ADN tales como microondas e irradiación UV. Es muy probable que estos factores causen un daño de amplio alcance en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN, y en el montaje y mantenimiento de cromosomas. Los rangos de dosis para los rayos-X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgenes para periodos de tiempo prolongados (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgenes. Los rangos de dosis para los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la vida media del isótopo, la fuerza y tipo de radiación emitida, y la captación por parte de las células neoplásicas.

[00114] Los términos “contactada” y “expuesta,” cuando se aplican a una célula, se usan aquí para describir el proceso por el que un constructo terapéutico y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico son administrados a una célula objetivo o son colocados en yuxtaposición directa con la célula objetivo. Para lograr la muerte o estasis celular, ambos agentes son administrados a una célula en una cantidad combinada efectiva para matar a la célula o evitar que se divida.

### c. Inmunoterapia

[00115] Por lo general, la inmunoterapia depende del uso de células y moléculas inmunoefectoras para señalar y destruir células cancerígenas. El inmunoefector puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo también puede servir como un efector de terapia o puede reclutar otras células para realmente matar a las células. El anticuerpo también puede ser conjugado con una droga o toxina (quimioterapéutica, radionúclido, cadena ricin A, toxina cólera, toxina pertussis, *etc.*) y sirve meramente como agente de señalización. Alternativamente, el efector también puede ser un linfocito que lleva una molécula superficial que interactúa, directa o indirectamente, con la célula tumoral objetivo. Varias células efectoras incluyen células T y células NK.

[00116] Así, la inmunoterapia podría ser usada como parte de una terapia combinada, conjuntamente con una terapia con el péptido de señalización de tumores. El enfoque general para la terapia combinada se discute más adelante. Por lo general, las células tumorales deben llevar un marcador que es receptivo de la señalización, es decir, no está presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores de tumores y cualquiera de ellos puede ser adecuado para la señalización en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario,

antígeno específico de próstata, antígeno asociado con tumores urinarios, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógeno, receptor de laminina, *erb B* y p155.

**d. Genes**

5 [00117] En otra realización, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que el polinucleótido terapéutico es administrado antes, después o a la misma vez que el primer agente terapéutico que comprende un péptido de señalización de tumores aislado que contiene una unidad de fijación de CRKL. La administración del agente terapéutico junto con un Segundo vector que codifica uno de los siguientes productos génicos tendrá un efecto anti-hiperproliferativo combinado en los tejidos a los que se dirige.

**e. Cirugía**

10 [00118] Aproximadamente el 60% de personas con cáncer se someterán a algún tipo de cirugía, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de determinación del estadio, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento contra el cáncer que puede ser usada junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias  
15 alternativas.

[00119] La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso es físicamente retirado, extirpado y/o destruido. La resección de tumores se refiere a la remoción física de por lo menos una parte de un tumor. Además de la resección de tumores, el tratamiento por cirugía incluye cirugía láser, criocirugía,  
20 electrocirugía, y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). También se contempla que la presente invención puede ser usada junto con la remoción de cánceres superficiales, pre cánceres, o cantidades incidentales de tejido normal.

[00120] Luego de extirpada parte de o todas las células, tejido o tumor cancerosos, se puede haber formado una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede  
25 lograr por perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anti-cancerígena adicional. Dicho tratamiento puede ser repetido, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ó 12 meses. Estos tratamientos también pueden tener dosis variables.

**f. Otros agentes**

[00121] Se contempla que se pueden usar otros agentes en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación creciente de los receptores de la superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apópticos. Los agentes inmunomoduladores pueden incluir factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta, y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocina; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, y otras quimiocinas. Además se contempla que la regulación creciente de los receptores de la superficie celular o sus ligandos tales como Fas / Fas ligando, DR4 o DR5 / TRAIL potenciarían las capacidades de inducción apoptótica de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino sobre las células hiperproliferativas. Aumentar la señalización intracelular elevando el número de uniones GAP aumentaría los efectos anti-hiperproliferativos en población de células hiperproliferativas vecina. En otras realizaciones, los agentes citostáticos o de diferenciación pueden ser usados en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia anti-hiperproliferativa de los tratamientos. Los inhibidores de la adhesión celular se contemplan para mejorar la eficacia de la presente invención. Ejemplos de inhibidores de adhesión celular son inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAKs) y Lovastatina. Además se contempla que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tal como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento.

[00122] También se puede usar la terapia hormonal conjuntamente con la presente invención o en combinación con cualquier otra terapia contra el cáncer previamente descrita. El uso de hormonas puede ser empleado en el tratamiento de ciertos cánceres tales como cáncer de seno, próstata, ovario, o cervical para bajar el nivel o bloquear los efectos de ciertas hormonas tales como la testosterona o el estrógeno. Este tratamiento se usa con frecuencia en combinación con por lo menos una otra terapia contra el cáncer como una opción de tratamiento o para reducir el riesgo de metástasis.

### **EJEMPLOS**

[00123] Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar más los varios aspectos de la invención. Los expertos en el arte deben apreciar que las técnicas reveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas y/o composiciones que el inventor ha descubierto funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto pueden ser

consideradas como que constituyen modos preferidos para su práctica. No obstante, aquellos con conocimientos en el arte deben apreciar, a la luz de la presente revelación, que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se revelan y aún así obtener un resultado igual o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención

### Ejemplo 1

#### Selección de péptidos que se dirigen al tumor *in vivo*

5            [00124]        Una librería de péptidos aleatorios phage display (Arap *et al.*, 1998; Pasqualini y Ruoslahti, 1996; Pasqualini *et al.*, 2001) fue administrada intravenosamente a ratones nu/nu (desnudos) que llevaban xenoinjertos de cáncer de próstata humano derivado de DU145 y los tumores fueron recuperados luego de un marco de tiempo de circulación de 24 horas. Luego de tres rondas de selección, se recuperó una población enriquecida de fago de señalización de tumores y se secuenció el ADN correspondiente a los insertos péptidos exhibidos por los clones de fagos individuales (Tabla 2). El péptido dominante fue seleccionado, secuencia aminoácido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) para la caracterización funcional. Primero, la especificidad de la señalización de tumores del péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) fue evaluada *in vivo* en ratones 10 que llevaban tumores derivados de DU145. Luego de la administración intravenosa sistémica del clon de fago de exposición YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1), se observó una marcada dirección hacia los xenoinjertos de tumores (el fago sin insertos sirvió como control negativo) se notó ninguna o una localización apenas detectable de fagos en varios órganos de control. Consistentemente, las células de cáncer de próstata 15 DU145 también fueron señalizadas *in vitro* usando un ensayo de separación de fase acuosa a orgánica (Giordano *et al.*, 2001) y un ensayo de inmunofluorescencia en base a fagos (células KS1767) y se descubrió que el fago que exhibe el péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) se fija las superficies de las células tumorales mucho más que a un fago de control negativo que no exhibe insertos de péptido 20 (FIG. 1A, B).

25

Tabla 2:

| Péptidos que se dirigen al tumor (n=75) |            |
|-----------------------------------------|------------|
| Secuencia                               | Frecuencia |
| YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1)      | 14.7 %     |
| LGCMAFMLREFEGATHACTQ (SEQ ID NO:2)      | 10.7%      |
| RGCTEAAGLVIGITTHQCGN (SEQ ID NO:3)      | 4.1%       |
| IGCNHPSPLGSTVVPTYCFK (SEQ ID NO:4)      | 4.1%       |
| GTCPRQFFHMQEFWPSDCSR (SEQ ID NO:5)      | 4.1%       |
| DRCVLVRPEFGRGDARLCHS (SEQ ID NO:6)      | 2.8%       |
| EGCSDIMNTAAERVTDGCSY (SEQ ID NO:7)      | 2.8%       |
| VFCCGSYCGGVEMLASRCGH (SEQ ID NO:8)      | 2.8%       |
| RECGRTVHRYPWGSPESCER (SEQ ID NO:9)      | 2.8%       |
| DACSRFLGERVDATAAGCSR (SEQ ID NO:10)     | 2.8%       |
| GNCMGLQVSELFMGPYKCRQ (SEQ ID NO:11)     | 2.8%       |
| Otro                                    | 45.5%      |

[00125] Luego se evaluó la capacidad de internalización del péptido seleccionado. Para este fin, se fusionó un péptido proapoptótico que específicamente señala membranas mitocondrias eucarióticas (Arap *et al.*, 2004; Javadpour *et al.*, 1996; Ellerby *et al.*, 1999; Kolonin *et al.*, 2004; Zurita *et al.*, 2004) con el péptido que se dirige al tumor. La matanza de células señaladas con relación a los controles (FIG. 1C), indicó que el péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) media la internalización dirigida a ligandos. Se confirmó la muerte celular programada mediante un ensayo de tinción con anexina-V (FIG. 1D). Cabe notar que la señalización selectiva e internalización de péptidos pro-apoptóticos ofrece posibilidades para el diseño de terapias antitumorales en base a peptidomiméticos señalizadas modulares (Arap *et al.*, 2004; Ellerby *et al.*, 1999; Kolonin *et al.*, 2004; Zurita *et al.*, 2004). Juntos, estos resultados muestran que el péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) señala células tumorales y permite la internalización.

Reactivos

[00126] Todas las líneas celulares eran de la American Tissue Type Collection (ATCC). En los estudios aquí descritos se usaron los siguientes anticuerpos: anti-CRKL (Santa Cruz, Cell Signaling, Epitomics o Upstate Biothechnology), anti-fosfo-CRKL (Cell Signaling), anti-integrina  $\beta_1$  (Chemicon o BD Transduction Laboratories), anti-IL11R (Santa Cruz), anti-integrina  $\beta_3$  y anti-integrina  $\beta_5$  47, anti-EGFR48, anti-grb2 (Santa Cruz), anti-integrina alfa 6 (Chemicon), anti-AHSG/Feutin A (R&D Systems), suero pre-inmuno (Jackson Laboratory), anti-FAK (Upstate), anti-Histona H1 (Santa Cruz), anti-fosfo-paxilina (Cell Signaling), anti-fosfo-130Cas (Santa Cruz), anti-fosfo-Erk1/2 (Cell

Signaling o Biosource), anti-fosfo-Elk-1 (Cell Signaling), anti-His (Santa Cruz), anti-gst (Santa Cruz), y anti-GAPDH (Ambion). Los péptidos fueron sintetizados y ciclizados según nuestras especificaciones (AnaSpec). Se obtuvieron comercialmente ratones desnudos macho de seis semanas de edad (Harlen) y se generaron xenoinjertos de tumor como se ha descrito (Arap *et al.*, 2004; Marchio *et al.*, 2004). El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC; por sus siglas en inglés) del Centro del Cáncer M. D. Anderson de la Universidad de Texas (UTMDACC) revisó y aprobó todos los procedimientos experimentales.

### Selección de librerías de péptidos aleatorios por phage display

[00127] Se realizó una selección de fagos *In vivo* según se describió (Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2004; Pasqualini y Ruoslahti, 1996; Pasqualini *et al.*, 2001). Una librería de fagos aleatorios que exhibía un inserto con la disposición general  $X_2CX_{12}CX_2$  (SEQ ID NO:124)(C, cisteína; X, cualquier residuo) fue administrada sistémicamente (vena de la cola) a ratones desnudos atímicos que llevaban xenoinjertos de tumor derivados de las células cancerígenas DU145 humanas y fue dejada circular durante 24 horas. Los ratones fueron puestos bajo anestesia profunda, se extirparon los tumores, se pesaron, y la población de fagos fijada fue recuperada y procesada (Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2004; Pasqualini y Ruoslahti, 1996; Pasqualini *et al.*, 2001). Se realizaron tres rondas en serie de selección *in vivo*.

### Ejemplo 2

#### Una secuencia del péptido que se dirige al tumor imita un dominio extracelular de la integrina reguladora

[00128] Para determinar si la secuencia del péptido identificada imita una proteína nativa, se realizó una investigación de similitud de YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) y de otras secuencias de péptidos seleccionadas. Mediante la utilización de una búsqueda de blastos estándar contra las bases de datos en línea seguida del alineamiento de secuencia de proteínas, se descubrió que todos los péptidos únicos exhibidos por fagos se parecían a las secuencias presentes en la integrina  $\beta_1$ . Inesperadamente, la secuencia de péptido dominante YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) tenía similitud con el dominio extracelular la plexin-semaforin-integrina (PSI) (residuos 26-78) de la cadena de integrina  $\beta_1$  (FIG. 2A; además, se descubrió que otros péptidos seleccionados también aparecían

dentro de la misma región (FIG. 2C). Luego se determinó si la similitud de la secuencia del péptido seleccionada YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) era específica para el dominio PSI de la secuencia de la integrina  $\beta_1$  o común a otras cadenas de integrina  $\beta$  conocidas. Luego de un análisis adecuado, y de una preparación de modelos moleculares, se concluyó que la identidad de secuencia entre YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) y el dominio PSI de la integrina  $\beta_1$  era en efecto el mejor alineamiento (FIG. 2B).

### Análisis de alineamiento de secuencia

[00129] El alineamiento de secuencia entre los péptidos de fagos que se dirigen al tumor y la integrina  $\beta_1$  analizado utilizando el software Peptide Match codificó en Perl 5.8.1 en base a RELIC50. El programa calcula la similitud en base a un tamaño de ventana de residuos predefinida entre una secuencia de péptido seleccionada por afinidad y la secuencia de proteína objetivo del terminal proteico N- a C- en cambios de un residuo. Los puntajes de similitud péptido-proteína para cada residuo fueron calculados en base a una matriz de substitución de aminoácidos BLOSUM62 modificada para que se ajuste a una representación de aminoácidos raros. Los umbrales fueron fijados en por lo menos 4 residuos idénticos entre el péptido y el segmento de proteína para discriminar similitudes significativas de coincidencias de fondo no específicas.

### Ejemplo 3

#### Una proteína adaptado ra citoplásmica sirve como receptor para el péptido que se dirige al tumor tipo dominio PSI

[00130] El dominio PSI de la integrina ha sido bien caracterizado por su actividad regulatoria (Shi *et al.*, 2005; Mould *et al.*, 2005; Arnaout *et al.*, 2005; Juliano *et al.*, 2004). Dados los resultados de la selección, parece que el dominio PSI podría funcionar también como un lugar de fijación ligando-receptor dentro de las integrinas  $\beta_1$ . En vista de esto, se usó cromatografía de afinidad para identificar los socios de fijación al péptido que se dirige al tumor YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1). Primero se pre-depuró un extracto de células derivadas de DU145 a través de una columna de péptido de control y luego el extracto pre-depurado se pasó a través de una columna de péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) que se dirige al tumor seguido por una levigación ácida. Se detectó que una banda de gel específica correspondiente a una proteína ~40-KDa se levigaba de la columna.

[00131] La espectrometría de masa y el análisis de la base de datos revelaron que la identidad de la proteína de banda de gel era el regulador del virus del tumor del pollo número 10 de la accesión # NP005198 de la proteína tipo quinasa (SEQ ID NO:22) (diez Hoeve *et al.*, 1993) (llamada CRKL). Estos resultados fueron validados mediante la  
 5 inmunotransferencia de la proteína purificada con un anticuerpo anti-CRKL. Luego, las proteínas de fusión His-tag recombinadas de CRKL (rCRKL) y sus tres dominios correspondientes rCRKL-SH2, rCRKL-SH3 (N), y rCRKL-SH3 (C) fueron diseñadas y construidas para obtener la determinación de la fijación. Se descubrió que el péptido YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) fijado a rCRKL preferentemente a través  
 10 de los dos dominios SH3 de la proteína; por el contrario, se detectó poca o ninguna fijación a través del dominio SH2 o a las proteínas de control (FIG. 3A). Varios clones de fago que exhibieron secuencias de péptidos no relacionadas no mostraron fijación alguna cuando se probaron bajo condiciones experimentales similares. También se realizaron estudios de fijación con un péptido sintético derivado del dominio PSI nativo de la integrina  $\beta_1$   
 15 (secuencia NSTFLQEGMPTSA (SEQ ID NO:23); residuos 50 a 62), lo que se superpone a las secuencias de péptidos seleccionadas de exhibición de fagos dentro de la región PSI nativa (FIG. 2A,C). Nuevamente, el péptido PSI-derivado de la integrina  $\beta_1$  NSTFLQEGMPTSA (SEQ ID NO:23) se fijó a rCRKL, dominio rCRKL-SH3 (N), y dominio rCRKL-SH3 (C) (FIG. 2B). Además, se generaron secuencias de péptidos cíclicas  
 20 y lineales del dominio PSI y se descubrió que los enlaces bisulfuros cíclicos presentes en el dominio PSI no eran esenciales para la fijación a la CRKL (FIG. 3C). Finalmente, se demostró que la interacción entre el dominio SH3 (C) y el péptido que se dirige al tumor es específicamente inhibida por los péptidos sintéticos correspondientes y por el clon de fago mismo (FIG. 3D). Estos descubrimientos muestran que el péptido que se dirige al tumor y  
 25 la réplica del dominio PSI específico de la integrina  $\beta_1$ , YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1), señalan los dominios SH3 de la CRKL.

#### **Cromatografía de afinidad y espectrometría de masa.**

[00132] Las columnas de afinidad de péptidos estándar fueron hechas por la resina de inmovilización EDC y DADPA (Pierce). Los extractos de células tumorales DU145 fueron preparados y pasados primero por una columna de péptido de control no  
 30 específico seguido por la columna de péptido dirigido al tumor. Las columnas fueron lavadas extensamente, luego levigadas con glicina (pH 2.2), y analizadas por SDS-PAGE. Luego, los geles fueron teñidos con Coomassie. Se detectó una banda de ~40KDa y fue extirpada para ver la secuencia proteica mediante espectrometría de masa en el UTMDACC

86

Proteomic Core Facility. La proteína fue identificada como CRKL. Se realizó una purificación de afinidad de la CRKL de un medio sin suero y se confirmó mediante el uso de proteína de fusión gst-tag recombinada que expresa ya sea el péptido que se dirige al tumor o un péptido de control mutante (Pro→Ala). Aproximadamente 200 ml de medio libre de suero (48 horas de cultivo) fueron concentrados para una purificación de afinidad. Las proteínas de fusión recombinadas fueron unidas a las perlas de resina gst y cargadas en una columna. El medio libre de suero concentrado fue agregado a las columnas unidas e incubadas de un día para otro. Luego de varias lavadas la CRKL fijada fue levigada mediante Western blotting. La transferencia fue probada con anticuerpos anti-gst y anti-CRKL.

### Ensayos de fijación de fagos y proteína-proteína

[00133] Se realizaron ensayos de fijación de fagos en proteínas purificadas tal como se ha descrito (Giordano *et al.* 2001). Las proteínas recombinadas fueron revestidas en pocillos múltiples tal como se ha descrito anteriormente (Cardo-Vila *et al.*, 2003; Smith y Scott, 1993). Brevemente, las proteínas fueron inmovilizadas en los pocillos múltiples de un día para otro a 4°C 50 µl de 1 µg/ml en PBS. Los pocillos fueron lavados dos veces con PBS, bloqueados con PBS que contiene 3% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente, e incubados con fago que se dirige al tumor tipo silvestre  $10^9$  T.U. (YRCTLNSPFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:1), fago revuelto (YRFCTSPFHEWHLENTDMCA (SEQ ID NO:26), YRECTDSPHEFHLWNTMCAF (SEQ ID NO:27), YRCETDSPHEFHLWNTMCAF (SEQ ID NO:29), YRCETDSPHEFHLWNTFCAM (SEQ ID NO:30)), fago mutante (YRCTLNSAFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:25), YRCTLNSPAAAEDMTHECHA (SEQ ID NO:28)), fago cíclico derivado de PSI (CNSTFLQEGMPTSAC; SEQ ID NO:77) o fago fd-tet en 50 µl de PBS que contiene 1.5% BSA. Luego de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados diez veces con PBS y los fagos fueron recuperados por infección bacterial. ELISA con anti-CKRL policlonal confirmó la presencia y concentración de las proteínas recombinadas CRKL en los pocillos. Para probar la fijación del fago que se dirige al tumor a las proteínas que contienen SH3, las placas de pocillos múltiples fueron revestidos a 4°C de un día para otro con 250 ng/ml de dominios gst-SH3 recombinados (CKRL-D1, CKRL-D2, grb2-D1, grb2-D2, Lyn, src; Pronomics), proteína rCKRL, y controles negativos gst o BSA. Para los estudios de fijación de mutantes SH3 (C), se revistieron dominios de SH3-C tipo silvestre y mutante SH3 (C) con 2 µg/ml de His-tag recombinada. Se agregó fago que se dirige al tumor ( $10^{10}$  T.U.) o fago fd-tet (sin

insertos) a cada pocillo y se realizó un ensayo de fijación tal como se describió arriba. El experimento de interacción proteína-proteína entre la CRKL u la integrina  $\beta_1$  se llevó a cabo en pocillos revestidos con integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  o  $\alpha_v\beta_5$  (Chemicon) a 1  $\mu\text{g/pocillo}$ . Para evaluar la fijación inhibitoria de la CRKL a la integrina  $\beta_1$  por gst-PSI, la CKRL y una  
 5 concentración creciente de gst-PSI o gst fueron pre-incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de agregarlas a los pocillos revestidos. Luego de 3 horas, la fijación de la CKRL a las integrinas fue detectada usando un anticuerpo anti-CKRL seguido por un IgG anti-conejo conjugado HRP. Para confirmar que se hayan fijado cantidades iguales de integrina a las placas, se realizaron experimentos paralelos usando  
 10 una dilución de 1:1500 de un anticuerpo anti-integrina (Amersham Pharmacia).

### **Diseño y construcción de fago que se dirige al tumor revuelto y mutante**

[00134] Para generar los clones de fago para estudiar las propiedades de fijación a la proteína CRKL, el phage displaying revolvió las secuencias y mutantes de péptidos diseñados y contruidos (Pro $\rightarrow$ Ala y Phe-Phe-Trp $\rightarrow$ Ala-Ala-Ala) a partir del péptido de fago que se dirige al tumor que se fija a la CRKL  
 15 YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1). Las secuencias de péptidos revueltos (YRFCTSPFHEWHLENTDMCA (SEQ ID NO:26), YRECTDSPHEFHLWNTMCAF (SEQ ID NO:27), YRCETDSPHEFHLWNTMCAF (SEQ ID NO:29), YRCETDSPHEFHLWNTFCAM (SEQ ID NO:30) mutantes (YRCTLNSAFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:25) y YRCTLNSPAAEDMTHECHA (SEQ ID NO:28)) o fago nativo derivado del PSI (CNSTFLQEGMPTSAC; SEQ ID NO:77) fueron clonados en vectores fUSE 5 SfiI-digeridos (Smith y Scott, 1993). Brevemente, 500 ng de cada una de las plantillas de oligonucleótidos sintéticos que correspondían a los péptidos exhibidos (Sigma-Genosys) fueron convertidas en ADN de doble fila mediante la amplificación PCR con el partidor fijado a 5'  
 25 GTGAGCCGGCTGCCC 3' (SEQ ID NO:68) y 5' TTCGGCCCCAGCGGC 3' (SEQ ID NO:69) (Sigma-Genosys) y 2.5 U de Taq-DNA polimerasa (Promega) en 20  $\mu\text{l}$  de la siguiente manera: 94°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s, seguido por 72°C durante 5 min. Las secuencias de ADN de doble fila que contenían lugares de restricción BglI en las regiones flanqueadas  
 30 por insertos fueron purificadas usando un kit de remoción de nucleótidos QIAquick (Qiagen) y levigadas. Los oligonucleótidos fueron digeridos con BglI durante 2 horas a 37°C, re-purificados y ligados en el vector fUSE5 SfiI-digeridos. Los clones de fago generados fueron amplificados con PCR para verificar la correcta inserción y secuencia

nucleótida. Los clones de fago individuales fueron probados en ensayos de fijación de fagos.

### Ensayos de fijación de péptidos e internalización

[00135] El péptido sintético que se dirige al tumor (YRCTLNSPFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:1) o péptido PSI-derivado (NSTFLQEGMPTSA; SEQ ID NO:23) fueron revestidos en placas multipocillos seguido de bloqueo y lavado. Se agregaron proteínas His-tag recombinadas a las placas revestidas: rCRKL, dominio rCRKL-SH2, dominio rCRKL-SH3 (N), y dominio rCRKL-SH3 (C). Una proteína de control no relacionada ( $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glicoproteína; AHSB) sirvió como un control negativo. Las mezclas fueron incubadas, lavadas y etiquetadas con anticuerpos apropiados. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) fueron agregados seguidos por la adición de sustrato TMB (Calbiochem), y analizados por un lector ELISA automatizado (Bio-Tek). Para determinar la actividad inhibitoria del péptido que se dirige al tumor, el péptido PSI-derivado, o el clon de fago que exhibe el péptido que se dirige al tumor correspondiente fueron incubados con el dominio CRKL-SH3 (C). Las secuencias de péptidos cíclicos no relacionados y fago sin inserto (fd-tet) sirvieron como controles negativos. Los agregados coloidales fueron incubados y agregados a los pocillos revestidos con el péptido que se dirige al tumor. Luego de la incubación, los pocillos fueron lavados, etiquetados con los anticuerpos apropiados, y procesados como se ha descrito arriba.

[00136] La capacidad de internalización del péptido que se dirige al tumor fusionado a través de un puente de glicinilglicina a una secuencia pro-apoptótica fue probada tal como se describe en Arap *et al.*, 2004; Ellerby *et al.*, 1999; Kolonin *et al.*, 2004; Zurita *et al.*, 2004). El péptido conjugado que se dirige al tumor, YRCTLNSPFFWEDMTHECHAGG-D(KLAKLAK)<sub>2</sub>(SEQ ID NO:67) o el péptido de control no señalizado D(KLAKLAK)<sub>2</sub>(SEQ ID NO:70) fueron sintetizados y se agregaron concentraciones de péptido equimolar en aumento a las células DU145. La viabilidad celular fue probada con el reactivo WST-1 (Roche) y teñida con annexin-V para ver la apoptosis (Zurita *et al.*, 2004; Cardo-Vila *et al.*, 2003). Para los estudios de localización de fagos que se dirigen al tumor, se incubaron células con 10<sup>9</sup> T.U. que se dirige al tumor (YRCTLNSPFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:1) o un fago de control negativo (fd-tet) durante 6 y 24 horas. Los pocillos fueron lavados con 20 mM de glicina para retirar el fago fijado a la superficie celular no específica y luego fueron fijados con 4% de paraformaldehído. Las células no permeabilizadas fueron incubadas con anticuerpo

bacteriófago anti-fd de conejo (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente seguido por 1 hora de incubación con anticuerpo IgG anti-conejo etiquetada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Nuevamente se fijaron células con 4% de paraformaldehído y se montaron en presencia de DAPI (Vector Laboratories) y se adquirieron imágenes con un  
5 microscopio de fluorescencia Olympus.

#### Ejemplo 4

##### Caracterización de la interacción con CRKL

[00137] Otros estudios han demostrado que los dominios SH3 se fijan a las unidades PXXP y no-PXXP además de las unidades que contienen un residuo Pro simple (Mayer, 2001; Sicheri *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1997). Puesto que la secuencia establecida en SEQ ID NO:1 no contiene ninguna de esas unidades  
10 conocidas, se usó la mutagenesis dirigida al lugar para evaluar los atributos de fijación del péptido que se dirige al tumor. Los resultados de estos estudios mostraron que la fijación al dominio CRKL-SH3 (C) depende del residuo Pro y del puente bisulfuro Cys-Cys cíclico presente en el péptido que se dirige al tumor (FIG. 4A); el fago sin insertos fd-tet y los péptidos cíclicos sintéticos no relacionados sirvieron como controles negativos. También  
15 se realiza un análisis mutacional del dominio SH3 (C) de la CRK y los resultados mostraron la región de fijación entre residuos Gly<sub>236</sub> y Trp<sub>277</sub> (FIG. 4C,D). Además, se mostró que tanto el fago que se dirige al tumor (SEQ ID NO:1) como el fago PSI-derivado (SEQ ID NO:77) se fijan a la CRKL recombinada (FIG. 4B). Más aún, usando cromatografía de afinidad, se estableció que la CRKL puede ser purificada a partir de un  
20 medio de condición libre de suero DU145, y que una columna de control preparada con una forma mutante del péptido que se dirige al tumor ya no se fija a la CRKL en niveles detectables bajo condiciones experimentales idénticas. Usando ensayos de co-inmunoprecipitación recíproca con fracciones de membrana, se estableció que la CRKL y la integrina  $\beta_1$  forman un complejo de superficie celular; por el contrario, los anticuerpos de  
25 control levantados contra receptores transmembrana no relacionados que incluyen el receptor anti-IL11, receptor anti-EGF, u otras integrinas (anti- $\beta_3$  y anti- $\beta_5$ ) no mostraron asociación alguna con la CRKL o la integrina  $\beta_1$ . Finalmente, se demostró que la interacción proteína-proteína entre la CRKL y la integrina  $\beta_1$  puede ser inhibida de manera dosis-dependiente por el dominio PSI expresado como una proteína recombinada (IC<sub>50</sub>=20  
30  $\eta$ m); de acuerdo con los estudios de co-inmunoprecipitación, las integrinas de control no mostraron fijación alguna (FIG. 5).

### Constructos mutantes

[00138] Todos los conjuntos de partidores se resumen en la (Tabla 3). El marco de lectura abierta de ADNc de la CRKL de largo total (Invitrogen) fue amplificado con PCR y clonado en un vector de expresión pET28a (Novagen). Los ADNc correspondientes a cada uno de los dominios SH fueron amplificados con PCR y clonados en los lugares de restricción Sac I y Xho I del vector. Todos los constructos fueron verificados por digestión de restricción y secuencias de ADN, transformados en la cepa de bacterias BL21 (Stragene) y las proteínas recombinadas fueron purificadas en columnas His-tag (Qiagen). Las proteínas recombinadas purificadas fueron verificadas a través del teñido Coomassie y el análisis Western blot usando los anticuerpos anti-CRKL y anti-His.

[00139] Los mutantes de CRKL en el dominio SH3 (terminal carboxilo) fueron generados por mutagenesis PCR. Los conjuntos de partidores fueron diseñados para retirar 60 bp ( $\Delta 1$  y  $\Delta 2$ ) y 54 bp ( $\Delta 3$ ) y mantener el marco de lectura. Para los constructos del dominio PSI, se produjeron las formas de péptido cíclico y lineal del dominio PSI. Luego de recocer los oligonucleótidos PSI (Tabla 3), los oligonucleótidos de doble fila fueron purificados luego de la digestión con EcoRI usando el kit de remoción de nucleótidos (QIAGEN) y clonados en el vector pGEX4T-1. Para mostrar que la proteína CRKL se oligomeriza, crecientes concentraciones de gst-CRKL recombinada fueron incubadas con proteína CRKL inmovilizada (forma recombinada de His-tag) o BSA inmovilizado de un día para otro a 4°C seguido por tres lavados. Las interacciones proteína-proteína fueron detectadas usando un anticuerpo contra gst.

Tabla 3: Partidores de PCR (SEQ ID NOs:32-53)

|                                                                  |
|------------------------------------------------------------------|
| CRKL de largo completo:                                          |
| 5'-CACAGAGCTCAACACCATGTCCTCCGCCAGGTTCG-3'                        |
| 5'-CACACTCGAGCTCGTTTTTCATCTGGGTTTTGAGGG-3'                       |
| Dominio SH2 de la CRKL:                                          |
| 5'-CACAGAGCTCGCCACCATGTCCTCCGCCAGGTTCGACTCCT-3'                  |
| 5'-CACACTCGAGTTCCAGGTTATCTTCTGCTGTAGGC-3'                        |
| Dominio SH3 (N) de la CRKL:                                      |
| 5'-CACAGAGCTCGCCACCATGGGATCTGTCTCAGCACCCAACC-3'                  |
| 5'-CACACTCGAGATTCTGTGTGGATGGCAAAGGGGTG-3'                        |
| Dominio SH3 (C) de la CRKL:                                      |
| 5' CACAGAGCTCGCCACCATGAGATCCTCACCACACGGAAAGCATG-3'               |
| 5' CACACTCGAGGTTTTTCATCTGGGTTTTGAGGGTC-3'                        |
| CRKL-SH3-1:                                                      |
| 5'-CACCCCTTTGCCATCCACACAGAATTTGGCATTAGAGGTTGGTGACATCG-3'         |
| 5' CGATGTCACCAACCTCTAATGCCAAATTCTGTGTGGATGGCAAAGGGGTG-3'         |
| CRKL-SH3-2:                                                      |
| 5' CCCTGTGCTTATGACAAGACTGCCGAAGGCGAAGTGAACGGGGCGCAA-3'           |
| 5' TTTGCGCCCGTTCACTTCGCCTTCGGCAGTCTTGTCATAAGCACAGGG-3'           |
| CRKL-SH3-3:                                                      |
| 5'-CAAGGATGAATATAAATGGCCAGTGGTTTGACCCTCAAACCCAGATGAAAACG-3'      |
| 5'-CGTTTTTCATCTGGGTTTTGAGGGTCAAACCACTGGCCATTTATATTCATCCTTG-3'    |
| CRKL-SH3-4:                                                      |
| 5'-CACCCCTTTGCCATCCACACAGAATTTTGACCCTCAAACCCAGATGAAAACG-3'       |
| 5'CGTTTTTCATCTGGGTTTTGAGGGTCAAATTCTGTGTGGATGGCAAAGGGGTG-3'       |
| Dominio PSI:                                                     |
| 5'-CACAGAGCTCGCCACCATGAATTTACAACCAATTTTCTGG-3'                   |
| 5'-CACACTCGAGTGTTTCCTTTGCTACGGTTGGTTAC-3'                        |
| Forma lineal del PSI:                                            |
| 5'-CATGGGCGAATTCACAAATTCAACATTTTACAGGAAGGAATGCCTACTTCTGCACGAC-3' |
| 5'-TCGAGTCGTGCAGAAGTAGGCATTCCTTCCTGTAAAAATGTTGAATTTGTGAATTCCG-3' |
| Forma cíclica del PSI:                                           |
| 5'-CACACCATGGGCGAATTCTGTTTAAAAGCAAATGCCAAATCATG-3'               |
| 5'-CACACTCGAGGCAACCCTTCTTTTTTAAGGCTTC-3'                         |

Ejemplo 5

La toma de imágenes moleculares muestra que la CRKL se puede ubicar fuera de las células

[00140] Consistente con la línea de evidencia presentada arriba, la toma de imágenes moleculares demostró la co-localización de la CRKL y la integrina  $\beta_1$ . Colectivamente, estos estudios indican una interacción molecular específica entre la CRKL y la integrina  $\beta_1$  en la superficie celular. Puesto que el péptido que se dirige al tumor se fija en la superficie de las células de cáncer prostático DU145, también se investigó la

posibilidad de que la CRKL también se pueda localizar fuera de la membrana celular. El análisis FACS de las células DU145 demostró una marcación de la superficie celular con un anticuerpo anti-CRKL en relación con los controles (FIG. 6A). La marcación de la superficie celular también fue confirmada mediante tñido inmunofluorescente y estudios de imágenes confocales bajo condiciones no permeabilizadas. La localización de la superficie celular a nivel ultraestructural también fue estudiada mediante microscopía electrónica de escaneo y de transmisión (TEM; FIG. 6B) también bajo condiciones no permeabilizadas. Estos enfoques clásicos de toma de imágenes volvieron a dar como resultado una marcación de la superficie celular de CRKL (FIG. 6B). También se usaron dos metodologías bioquímicas adicionales para confirmar la localización de la membrana celular de CRKL: marcación de la superficie celular por biotilación y fraccionación de la membrana detergente. Con ambos métodos independientes, se descubrió que la CRKL estaba presente en la membrana celular. Para estos estudios, los anticuerpos contra proteínas intracelulares no relacionadas sirvieron como controles negativos. En conjunto, estos resultados muestran que la proteína CRKL – además de su bien conocida presencia citoplasmática – también se localiza en la superficie celular.

#### **Localización en la superficie y membrana celular**

[00141] La marcación de la superficie celular con biotín se hizo según se ha descrito (Monferran *et al.*, 2004). Brevemente, células DU145 fueron marcadas con enlace Biotin-LC-LC-NHS EZ (Pierce) que no penetra membranas. Las proteínas de membrana biotiladas fueron lavadas, solubilizadas, y aclaradas seguido por inmunoprecipitación con perlas de streptavidin (Pharmacia). Se realizaron Western blots con los anticuerpos apropiados tal como se indicó. Se realizaron ensayos de fijación a la superficie celular en células DU145 como se describió, a través de la metodología de Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands (BRASIL) (Ciclos de Selección por Afinidad y Análisis Rápido de Ligandos Interactivos Selectivos) (Giordano *et al.*, 2001). La fraccionación de la membrana fue realizada tal como se ha descrito (Mintz *et al.*, 2003). Se sondearon inmunoblots con los anticuerpos apropiados según se ha indicado. Se adquirieron imágenes confocales en un microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss). Se cultivaron células DU145 en portaobjetos recubiertos con fibronectina, fijados con 4% de paraformaldehído (PFA) y marcados con los anticuerpos apropiados (anticuerpo de la CRKL policlonal y anticuerpo de la AHSB monoconal). Las imágenes por microscopía electrónica fueron adquiridas en la High Resolution Electron Microscopy Core Facility (Local Principal de Microscopía Electrónica de Alta Resolución) (escaneo JSM 5900 y

microscopios electrónicos de transmisión JEM 1010). Se prepararon conjugados de anticuerpos de nanopartículas de oro mezclando 20-25 nm o 40-45 nm de oro en borato sódico. Las nanopartículas unidas al oro fueron verificadas mediante análisis TEM. Las células DU145 fueron marcadas en hielo con anticuerpos apropiados (anti-CRKL monoclonal, integrina anti- $\beta_1$ , y anticuerpos anti-AHSG) seguido por anticuerpos secundarios fluorescentes conjugados y analizados por FACS.

### Ejemplo 6

#### Estudios funcionales y mecanismos de transporte potencial de la CRKL

[00142] Puesto que la CRKL no tiene un dominio transmembrana clásico, se realizaron estudios para evaluar si la CRKL es secretada o no de células tumorales. Los resultados mostraron que las células DU145 cultivadas en un medio libre de suero sí secretan la forma infoforilada de la CRKL. Por el contrario, la CRKL no fue detectada en el medio celular de control tal como se muestra en la inmunoprecipitación ya sea con anticuerpos anti-CRKL o con varios anticuerpos de control. Para evaluar la generalidad de estas observaciones, se estudió un panel de líneas de células tumorales en medio libre de suero y se descubrió que también secretan CRKL infoforilado (FIG. 7A), indicando así que es poco probable que este fenómeno sea específico para un tipo de célula. Luego, se realizaron estudios para determinar si la secreción de la CRKL tenía algún efecto detectable en la proliferación y migración celular. Para probar la especificidad, se agregó un anticuerpo neutralizador anti-CRKL al medio libre de suero de las células DU145 en cultivo. Los resultados muestran que el anticuerpo anti-CRKL sí neutraliza la CRKL extracelular y una reducida proliferación celular (FIG. 7B) y migración celular (FIG. 7C); varios anticuerpos de control o suero pre-inmuno no produjeron efectos detectables en la proliferación o migración celular (FIG. 7B,C). Para entender mejor el rol biológico de la CRKL en el contexto de células tumorales, se empleó la supresión de la CRKL por tecnología del ARNsi; una vez más, se descubrió que las reducciones significativas en la proliferación, adhesión, y migración celular se producía cuando la expresión de la CRKL se reducía (FIG. 8A-C). Como control adicional, se mostró que la disminución en la proliferación celular podía ser rescatada por CRKL exógena (FIG. 8D) y sólo se detectaron niveles de apoptosis de fondo (menos del 1%) en las células suprimidas con el ARNsi de la CRKL o en las células cultivadas en el medio libre de suero. La supresión del ARNsi de la CRKL en las células también se descubrió que tenían una fijación reducida del fago que se dirige al tumor a las células, sugiriendo que el fago que se dirige al tumor puede fijarse a través de la CRKL secretada.

[00143] Dado que la CRKL no tiene una secuencia terminal N hidrológico para la secreción de proteína a través del retículo endoplasmático y vía de secreción que depende de Golgi (Walter *et al.*, 1984), se determinó si los inhibidores de secreción podrían evitar la liberación celular de la CRKL. Los resultados de estos estudios mostraron que los

5 inhibidores tales como brefeldin A y tapsigargin no parecen inhibir la secreción de la CRKL; por el contrario, se descubrió que la glibenclamida, un inhibidor del cassette de fijación adenosina trifosfato (ABC)-transportadores, no evita que se libere la CRKL. Existen por lo menos cuatro procesos conocidos a través de los que una proteína – incluyendo ciertos factores de crecimiento y citocinas – puede ser secretada sin un péptido

10 de señal clásico (Nickel, 2003; Prudovsky *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que la CRKL puede ser secretadas a través de una vía de exportación no clásica usando transportadores ABC. Cabe notar que otros factores de crecimiento biológicamente activos tales como la interleucina-1 $\beta$  y el factor inhibitorio de la migración de macrófagos también usan sistemas de transportadores ABC (Marty *et al.*, 2005; Flieger *et al.*, 2003; Hamon *et al.*, 1997), lo

15 que sugiere una hipótesis plausible del transporte activo. No obstante, los resultados mostrados aquí proporcionados no excluyen la posibilidad de que la muerte celular – ya sea como parte de la selección clonal durante la progresión maligna o luego de la quimioterapia citotóxica—también podría general CRKL extracelular dentro del microambiente del tumor. Para obtener un mayor entendimiento con respecto a este complejo proteico, se

20 diseñaron ensayos de fijación para detallar las interacciones bioquímicas entre la CRKL, las integrinas  $\beta_1$ , y el péptido que imita el dominio PSI. Usando dos versiones diferentes de la CRKL recombinada (es decir, gst y his-tag), los resultados sugieren que la CRKL puede realmente homodimerizar, quizás a través de los dominios SH3 (Kishan *et al.*, 1997; Kristensen *et al.*, 2006). Puesto que la CRKL intracelular está implicada tanto en las vías

25 MAP quinasa como en las vías mediadas por integrina (Li *et al.*, 2003; Uemura *et al.*, 1999), se examinaron las proteínas fosforiladas en estas dos vías. Varias proteínas fosforiladas que incluyen paxillin, p130Cas, Erk1, Erk2, y Elk1, e incluso la misma CRKL fueron encontradas cuando la CRKL recombinada fue agregada a las células tumorales *in vitro*. Además, cuando la CRKL exógena fue agregada a las células de supresión del

30 ARNsi de la integrina  $\beta_1$ , se encontraron las proteínas fosforiladas reducidas Erk1 y Erk2, lo que indica que la activación de la vía ERK por parte de la rCRKL exógena depende de la expresión de la integrina  $\beta_1$ . Los mitógenos de control sirvieron para activar la vía que depende de la MAP quinasa y para estimular las células tumorales DU145 con el propósito de mostrar que la eficacia general de la maquinaria de señalización de células fue

35 mantenida en las células de supresión de ARNsi de la CRKL. Estos estudios demostraron que la CRKL secretada puede activar las vías mediadas por la integrina y la MAP quinasa.

Estudios del ARNsi

[00144] Se compró CRKL (mRNA accesión # NM\_005207), integrina  $\beta_1$  (mRNA accesión # NM\_002211), y ARNsi (Santa Cruz, Ambion y Dharmacon). Las secuencias oligonucleótidos ARNsi y los correspondientes fabricantes se resumen en (Tabla 4). Se usó oligofectamina (Invitrogen) o DharmaFect (Dharmacon) para transfectar los

5 RNsi a células DU145 ( $1-2 \times 10^5$  células por pocillo). Las células transfectadas fueron incubadas durante 48-72 horas antes de procesarlas. No se observe muerte o apoptosis celular en las células transfectadas como lo determinó el teñido con Annexin-V (Roche). Las células transfectadas fueron cosechadas y lisadas en presencia de inhibidores de proteasa. También se examine la actividad de fijación del fago que se dirige al tumor en las

10 células de supresión de la CRKL. Para los experimentos de rescate, se agregó hasta  $1.5 \mu\text{g}$  de CRKL recombinada exógenamente a las células transfectadas con ARNsi de la CRKL. Se usó proteína CRKL recombinada His-tag exógena ( $400 \text{ ng/ml}$ ) o proteínas de control (EGF,  $200 \text{ ng/ml}$ ; MIF,  $300 \text{ ng/ml}$ ; PMA,  $300 \text{ ng/ml}$ ) en los experimentos de supresión de la integrina  $\beta_1$ . Cantidades iguales de proteína fueron cargadas y resueltas por SDS-PAGE

15 seguid de un análisis Western blot con los anticuerpos apropiados. Los ensayos de proliferación celular fueron realizados con WST-1 (Roche). Los ensayos de migración celular fueron realizados en un ensayo en cámara Boyden (Corning).

Tabla 4: ARNsi

|                                       |
|---------------------------------------|
| Santa Cruz, CRKL:                     |
| GUCGUAUUGUCAAGAGUATT (SEQ ID NO:54)   |
| GUAGCAGACAACACACAAATT (SEQ ID NO:55)  |
| CAGCAGACCUAGAAAUUGUATT (SEQ ID NO:56) |
| Dharmacon, CRKL:                      |
| CCGAAGACCUGCCCUUUAUU (SEQ ID NO:57)   |
| GAAGAUAAACCUGGAAUAUGUU (SEQ ID NO:58) |
| GUCACAAGGAUGAAUAUAAUU (SEQ ID NO:59)  |
| AAUAGGAAUCCAACAGUUUU (SEQ ID NO:60)   |
| Ambion, CRKL:                         |
| GGUAUCCAAGCCCACCAAUTT (SEQ ID NO:61)  |
| GGAUGAAUAUAAUUGGCCATT (SEQ ID NO:62)  |
| Santa Cruz, integrina $\beta_1$ :     |
| GAGAUGAGGUUCAAUUUGATT (SEQ ID NO:63)  |
| GAUGAGGUUCAAUUUGAAATT (SEQ ID NO:64)  |
| GUACAGAUCCGAAGUUUCATT (SEQ ID NO:65)  |
| Dharmacon, control:                   |
| AUGAACGUGAAUUGCUCAAUU (SEQ ID NO:66)  |

## Ensayos de inmunoprecipitación

- [00145] Las células fueron sincronizadas durante 24-48 horas en un medio libre de suero RPMI seguido por centrifugación y filtración a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , y pre-absorbidas a anticuerpos de control. Un volumen igual de PBS fue agregado al sobrenadante recuperado antes de la inmunoprecipitación con los anticuerpos apropiados.
- 5 Se usó brefeldina A, glibenclamida, y taspigargin para los estudios de inhibición de secreciones. Se incubaron células con los compuestos en un medio libre de suero durante 9 horas antes de la inmuno precipitación con los anticuerpos apropiados. No se usó ningún detergente en los estudios de inmunoprecipitación. Usando la metodología antes descrita, la CRKL es encontrada en un estado soluble libre y no en las vesículas.

### Ejemplo 7

#### Señalización de tumores dirigida al ligando mediada por la CRKL

- 10 [00146] Luego se evaluó los atributos de señalización de tumores del fago de fijación de la CRKL en ratones que llevaban tumores. Primero, se diseñaron y produjeron constructos de fago que exhibían ya sea el péptido de fijación de CRKL o un panel de péptidos de control (mutante o revuelto). Se probaron los clones de fago en xenoinjertos de tumores humanos (células KS1767 de sarcoma de Kaposi y células DU145 de carcinoma
- 15 prostático) y un modelo de tumor de ratón isogénico (carcinoma mamario EF43-FGF4). Se observó una dirección marcada y específica la tumor luego de la administración sistémica del fago de fijación de la CRKL; por el contrario, los constructos de control no mostraron localización a tumores (FIG. 9A-D). Como se muestra en la FIG. 9, las secuencias de péptidos mutados P->A (YRCTLNSAFFWEDMTHECHA; SEQ ID NO:25), revuelto 1
- 20 (YRFCTSPFHEWHLENTDMCA; SEQ ID NO:26) y revuelto 2 (YRECTDSPHEFHLWNTMCAF; SEQ ID NO:27) no demostraron señalización de tumores. Estudios adicionales con péptidos que comprenden una mutación FFW->AAA adyacente al residuo prolina en SEQ ID NO:1 (YRCTLNSPAAAEDMTHECHA; SEQ ID NO:28) u otras dos secuencias revueltas (#3: YRCETDSPHEFHLWNTMCAF; SEQ ID
- 25 NO:29 y #4: YRCETDSPHEFHLWNTFCAM; SEQ ID NO:30) tampoco mostraron actividad de señalización para los mutantes. Más aún, los estudios mostraron que la dirección al tumor es inhibida cuando el fago de fijación de CRKL es pre-incubado con CRKL recombinada antes de administrarlo a ratones que llevan tumores (FIG. 10). También se descubrió que el fago de fijación de la CRKL era por lo menos 10 veces más
- 30 alto cuando se le comparaba con un fago de filiación de integrina  $\alpha_v$  (secuencia de péptido CDCRGDCFC (SEQ ID NO:31), llamada RGD-4C) que se usa típicamente como un

control positivo para este tipo de experimento (Hajitou *et al.*, 2006; Arap *et al.*, 1998; Pasqualini *et al.*, 2001; Giordano *et al.*, 2001; Javadpour *et al.*, 1996; Ellerby *et al.*, 1999; Pasqualini *et al.*, 1997).

[00147] Finalmente, se diseñó y realizó una prueba pre-clínica piloto que  
 5 incluía cuatro cohortes de ratones que llevaban tumores del mismo tamaño (FIG. 11). Los  
 animales recibieron los siguientes reactivos: (i) el péptido que imita el dominio PSI  
 sintético, (ii) el péptido que imita el dominio PSI sintético unido a un peptidomimético pro-  
 apoptótico (Arap *et al.*, 2004; Ellerby *et al.*, 1999; Kolonin *et al.*, 2004; Zurita *et al.*, 2004)  
 para inducir una apoptosis dirigida luego de la internalización mediada por receptores, (iii)  
 10 sólo el peptidomimético pro-apoptótico sintético, o (iv) el vehículo solo. Todos los péptidos  
 o peptidomiméticos fueron administrado en concentraciones equimolares. Estos resultados  
*in vivo* mostraron que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el péptido que imita  
 el dominio PSI no tuvo un efecto detectable en el crecimiento tumoral, mientras que el  
 peptidomimético pro-apoptótico objetivo inhibía significativamente el crecimiento tumoral.

#### Señalización e inhibición de tumores *in vivo*

15 [00148] Los experimentos de señalización *in vivo* con fago se realizaron  
 según se ha descrito (Hajitou *et al.*, 2006; Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2004; Kolonin *et al.*,  
*et al.*, 2004; Marchio *et al.*, 2004). Los animales usados en los experimentos fueron: ratones  
 desnudos macho que llevaban xenoinjertos DU145 humanos o ratones desnudos hembra  
 con xenoinjertos derivados de KS1767 de sarcoma de Kaposi humano subcutáneamente y  
 20 ratones hembra Balbo/c inmunocompetentes que llevaban tumores mamarios derivados de  
 EF43 ortotópicamente en el panículo adiposo mamario. Brevemente, los ratones que  
 llevaban tumores (~8 mm) fueron anestesiados e inyectados intravenosamente a través de la  
 vena de la cola con  $5 \times 10^{10}$  T.U. por ratón de fago tipo silvestre  
 YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1), o controles negativos: fago efd-tet (sin  
 25 insertos) y fago revuelto YRFCTSPFHEWHLENTDMCA (SEQ ID NO:26), fago  
 YRECTDSPHEFHLWNTMCAF (SEQ ID NO:27), fago YRCETDSPHEFHLWNTMCAF  
 (SEQ ID NO:29), fago YRCETDSPHEFHLWNTFCAM (SEQ ID NO:30) o fagos  
 YRCTLNSAFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:25) mutantes y fago  
 YRCTLNSPAAEDMTHECHA (SEQ ID NO:28). Los cohortes de dos ratones con  
 30 tumores del mismo tamaño recibieron cada uno un grupo de clones de fago. Luego de 24  
 horas, los tumores fueron disecados de cada ratón y se recuperó el fago mediante infección  
 bacterial y se normalizó por el peso del tejido. Los experimentos fueron repetidos dos veces  
 para cada modelo de tumor. Para la inhibición de la señalización de tumores, el fago que se

dirige a la CRKL fue incubado primero con gst-CRKL recombinada o proteína gst de control durante 30 minutos a 37°C, luego fue administrado en forma intravenosa a ratones que llevaban tumores de próstata. El fago fd sirvió como control negativo y el RGD-4C (Hajitou *et al.*, 2006; Arap *et al.*, 1998) sirvió como control positivo. Sólo se detectó una  
5 apoptosis de fondo mínima (<1% del total de células) mediante teñido con TUNEL (Promega) en secciones de tejido tumoral inmerso en parafina.

### **Terapia en ratones que llevan tumores**

[00149] Los ratones que llevaban tumores DU145 fueron agrupados por tamaño y divididos en cohortes individuales (n=4 ratones por grupo). El péptido que se dirige al tumor YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) fue sintetizado fusionado  
10 con la unidad proapoptótica  $D(KLAKLAK)_2$ (SEQ ID NO:70). El péptido no conjugado YRCTLNSPFFWEDMTHECHA (SEQ ID NO:1) o  $D(KLAKLAK)_2$ (SEQ ID NO:70) sirvieron como controles. Los péptidos sintéticos fueron administrados sistémicamente y los volúmenes de los tumores medidos tal como se ha descrito (Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2004).

### **Imágenes por Resonancia Magnética (MRI) Usando Péptidos de Señalización de la CRKL**

15 [00150] Se formaron hidrogeles de imidazol oro/fago con el fago de señalización de tumores (CRKL de señalización) y fago sin insertos como control. Se incorporó óxido de hierro en estos hidrogeles en un volumen final del 30% (por volumen). Esta preparación de hidrogel fue usada en un estudio de MRI subsiguiente en el que tres ratones que llevaban tumores de próstata (DU145) fueron inyectados intratumoralmente  
20 con cantidades equivalentes de AuFe solamente, hidrogeles no señalizados (con fago sin insertos) que contenían AuFe e hidrogeles señalizados con CRKL que contenían AuFe. El contraste negativo mediado por el núcleo férrico puede ser visto claramente y cuantificado usando imágenes por resonancia magnética (MRI).

\* \* \*

[00151] Todas las composiciones y métodos aquí revelados y reivindicados  
25 pueden ser hechos y ejecutados sin experimentación indebida a la luz de la presente revelación. Aunque las composiciones y métodos de esta invención han sido descritos en términos de realizaciones preferidas, será aparente para los expertos en el arte que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y métodos y en los pasos o en las

- secuencias de pasos del método aquí descrito sin alejarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será aparente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden ser substituidos por los agentes aquí descritos, obteniéndose resultados similares. Se considera que todos los substitutos similares y
- 5 modificaciones aparentes para los expertos en el arte están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### REFERENCIAS

Las siguientes referencias, en la medida en que brinden ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los establecidos aquí, son específicamente incluidas aquí como referencia.

- 5    Patente U.S. 3,817,837  
      Patente U.S. 3,850,752  
      Patente U.S. 3,939,350  
      Patente U.S. 3,996,345  
      Patente U.S. 4,275,149
- 10   Patente U.S. 4,277,437  
      Patente U.S. 4,366,241  
      Patente U.S. 4,472,509  
      Patente U.S. 5,021,236  
      Patente U.S. 5,889,155
- 15   Publicación de Patente U.S. 20040023415
  
- Arap *et al.*, *Cancer Cell*, 6:275-284, 2004.  
      Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.  
      Arap *et al.*, *Nat. Med.*, 8:121-127, 2002.
- 20   Arap *et al.*, *Science*, 279:377-380, 1998.  
      Arnaout *et al.*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:381-410, 2005.  
      Baichwal y Sugden, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, NY, 117-148, 1986.  
      Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
- 25   Barany y Merrifield, en: *The Peptides*, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.  
      Bedi *et al.*, *Blood*, 83:2038-2044, 1994.  
      Blume-Jensen y Hunter, *Nature*, 411:355-365, 2001.  
      Caldas *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3568-3573, 1994.
- 30   Cardo-Vila *et al.*, *Mol. Cell*, 11:1151-1162, 2003.  
      Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.  
      Cho y Stahelin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34:119-151, 2005.  
      Cleary y Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-7443, 1985.  
      Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- 35   Coffin, En: *Virology*, Fields *et al.* (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990.  
      Conner y Schmid, *Nature*, 422:37-44, 2003.

70

- Culver *et al.*, *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992.
- Ellerby *et al.*, *Nat. Med.*, 5:1032-1038, 1999.
- Flieger *et al.*, *FEBS Lett.*, 551:78-86, 2003.
- Giordano *et al.*, *Nat. Med.*, 7:1249-1253, 2001.
- 5 Goldstein *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 1:1311-1318, 1995.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics
- Graham y Prevec, En: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- 10 Grunhaus y Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hajitou *et al.*, *Cell*, 125:385-398, 2006.
- Hamon *et al.*, *Blood*, 90:2911-2915, 1997.
- Hermonat y Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- 15 Hollstein *et al.*, *Science*, 253(5015):49-53, 1991.
- Hovanessian *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 261:312-328, 2000.
- Hunter, *Cell*, 100:113-127, 2000.
- Hussussian *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994.
- Javadpour *et al.*, *J. Med. Chem.*, 39:3107-3113, 1996.
- 20 Juliano *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 32:443-446, 2004.
- Kamb *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):23-26, 1994.
- Kamb *et al.*, *Science*, 267:436-440, 1994.
- Kang *et al.*, *EMBO J.*, 19:2889-2899, 2000.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:37481-37487, 2000.
- 25 Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kishan *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 4:739-743, 1997.
- Kolonin *et al.*, *Nat. Med.*, 10:625-632, 2004.
- Kristensen *et al.*, *EMBO J.* 25:785-797, 2006.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- 30 Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Li *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 23:2883-2892, 2003.
- Mandava *et al.*, *Proteomics*, 4:1439-1460, 2004.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Manning *et al.*, *Science*, 298:1912-1934, 2002.
- 35 Marchio *et al.*, *Cancer Cell*, 5:151-162, 2004.
- Martin *et al.*, *Science*, 296:1652-1653, 2002.

- Marty *et al.*, *Glia*, 49:511-519, 2005.
- Mayer, J. *Cell Sci.*, 114:1253-1263, 2001.
- McGahon *et al.*, *Blood*, 83:1179-1187, 1994.
- Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, 1986.
- 5 Mintz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 21:57-63, 2003.
- Mochly-Rosen, *Science*, 268:247-251, 1995.
- Monferran *et al.*, *EMBO J.*, 23:3758-3768, 2004.
- Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54(13):3396-3397, 1994.
- Mould *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:4238-4246, 2005.
- 10 Nickel, *Eur. J. Biochem.*, 270:2109-2119, 2003.
- Nicolas y Rubinstein, En: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nobori *et al.*, *Nature*, 368(6473):753-756, 1994.
- 15 Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(23):11045-11049, 1994.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res*, 54(11):2848-2851, 1994.
- Orlow *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 15(1):17-24, 1994.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pasqualini y Ruoslahti, *Nature*, 380:364-636, 1996.
- 20 Pasqualini *et al.*, En: *Phage Display: A Laboratory Manual*, Barbas III *et al.* (Eds.), 22.1-22.24, Cold Spring Harbor Lab. Pres., NY, 2001.
- Pasqualini *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15:542-546, 1997.
- Pawson y Scott, *Science*, 278:2075-2080, 1997.
- Pendergast *et al.*, *Cell*, 75:175-185, 1993.
- 25 Physicians Desk Reference
- Prudovsky *et al.*, *J. Cell Sci.*, 116:4871-4881, 2003.
- Puil *et al.*, *EMBO J.*, 13(4):764-773, 1994.
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Ciencias Farmacéuticas de Remington 15<sup>a</sup> ed., pp 1035-1038 y 1570-1580
- 30 Ciencias Farmacéuticas de Remington, 18a Ed. Mack Printing Company, pp. 1289-1329, 1990.
- Ridgeway, En: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.* (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- 35 Rosenfeld, *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.

- Serrano *et al.*, *Science*, 267(5195):249-252, 1995.
- Shi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:30586-30593, 2005.
- Shin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:7607-7616, 2003.
- Sicheri *et al.*, *Nature*, 385:602-609, 1997.
- 5 Sinclair y O'Brien, *J. Biol. Chem.*, 277:2876-2885, 2002.
- Skorski *et al.*, *Blood*, 86:726-736, 1995.
- Skorski *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:1855-1865, 1994.
- Skorski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4504-4508, 1994.
- Smith y Scott, *Methods Enzymol.*, 217:228-257, 1993.
- 10 Stewart y Young, En: *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Szczulik *et al.*, *Science*, 253:562-265, 1991.
- Takagi *et al.*, *Cell*, 110:599-611, 2002.
- Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Tari *et al.*, *Blood*, 84:601-607, 1994.
- 15 Temin, En: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- ten Hoeve *et al.*, *Blood*, 84:1731-1736, 1994.
- ten Hoeve *et al.*, *Cancer Res.*, 54:2563-2567, 1994.
- ten Hoeve *et al.*, *Oncogene*, 8:2469-2474, 1993.
- Tsujimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
- 20 Tsujimoto *et al.*, *Nature*, 315:340-343, 1985.
- Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
- Uemura *et al.*, *Oncogene*, 18:3343-3353, 1999.
- Walter *et al.*, *Cell*, 38:5-8, 1984.
- Weinberg, *Science*, 254(5035):1138-1146, 1991.
- 25 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Xu *et al.*, *Nature*, 385:595-602, 1997.
- Zurita *et al.*, *Cancer Res.*, 64:435-439, 2004.

30

35

### REIVINDICACIONES

1. Un péptido de señalización de tumores aislado que comprende una unidad de fijación de la CRKL, en donde dicha unidad se define como:
  - 5 a) que tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos;
  - b) que tiene un grado de similitud a un mejor alineamiento de secuencia a la integrina  $\beta 1$  correspondiente (SEQ ID NO:13) de por lo menos 25%; y
 en donde el péptido de señalización tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos y se fija bajo condiciones fisiológicas a células que expresan CRKL.
- 10 2. El péptido de la reivindicación 1, en donde la unidad de fijación de la CRKL tiene un grado de similitud a un mejor alineamiento de secuencia de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos el 40%.
- 15 3. El péptido de la reivindicación 1, en donde la unidad de fijación de la CRKL tiene un grado de similitud a un mejor alineamiento de secuencia de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos el 50%.
- 20 4. El péptido de la reivindicación 1, en donde la unidad de fijación de la CRKL tiene un grado de similitud a un mejor alineamiento de secuencia de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) de por lo menos el 60%.
- 25 5. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido tiene una secuencia que no es idéntica a un mejor alineamiento de secuencia de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13).
6. El péptido de la reivindicación 1, en donde la unidad de fijación de la CRKL tiene un mejor alineamiento de secuencia a una región de dominio PSI de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13).
- 30 7. El péptido de la reivindicación 1, en donde la unidad de fijación de la CRKL tiene un mejor alineamiento de secuencia a una región de dominio PSI de la integrina  $\beta 1$  (SEQ ID NO:13) seleccionada del grupo que consiste de aminoácidos 10 a 29; 15 a 34; 18 a 37; 36 a 55; 39 a 58; 45 a 64; 94 a 113; 196 a 215; 198 a 213; 203 a 222; 244 a 263; 330 a 349; 377 a 396; 379 a 398; 380 a 399; 398 a 417; 400 a 419; 413 a 432; 447 a 466; 460 a 479; 35 460 a 479; 464 a 483; 469 a 488; 474 a 493; 475 a 494; 512 a 533; 519 a 538; 551 a 570;

574 a 593; 577 a 596; 579 a 598; 590 a 609; 596 a 615; 613 a 632; 615 a 634; 616 a 635; 644 a 663; 648 a 667; 663 a 682; 674 a 693; 682 a 701; 721 a 740; 727 a 746; y 779 a 798.

8. El péptido de la reivindicación 1, en donde la unidad de fijación de la CRKL tiene  
5 una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:78 a SEQ ID NO:123.

9. El péptido aislado de la reivindicación 1, definido además como un péptido cíclico.

10. El péptido aislado de la reivindicación 1, en donde dicho péptido está adherido a  
10 una molécula.

11. El péptido aislado de la reivindicación 10, en donde la molécula es una proteína y el  
péptido está conjugado o fusionado a la proteína para formar un conjugado de proteína, en  
donde el conjugado de proteína no es una proteína que ocurre naturalmente.

15

12. El péptido aislado de la reivindicación 11, en donde el péptido está posicionado en  
un terminal de la proteína.

13. El péptido aislado de la reivindicación 10, en donde dicha molécula es un agente  
20 pro-apoptosis, un agente anti-angiogénico, una citocina, un agente citotóxico, un  
medicamento, un agente quimioterapéutico, una hormona, un factor de crecimiento, un  
antibiótico, un anticuerpo o fragmento o cadena simple del mismo, un factor de  
supervivencia, un agente anti-apoptótico, un antagonista de hormonas, un antígeno, un  
péptido, una proteína, un agente de diagnóstico, un radioisótopo, o un agente de imágenes.

25

14. El péptido aislado de la reivindicación 13, en donde dicha molécula es un agente  
pro-apoptosis seleccionado del grupo que consiste de gramicidina; magainina; melitina;  
defensina; cecropina; (KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70); (KLAKKLA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:71);  
(KAAKKAA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:72); (KLGKKLG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:73); Bcl-2; Bad; Bak; Bax; y  
30 Bik.

15. El péptido aislado de la reivindicación 14, en donde dicho agente pro-apoptosis es  
(KLAKLAK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70).

25

16. El péptido aislado de la reivindicación 15, en donde dicha SEQ ID NO:70 consiste de aminoácidos D.

17. El péptido aislado de la reivindicación 13, en donde dicha molécula es un agente anti-angiogénico seleccionado del grupo que consiste de trombospondina, una angiostatina, factor de pigmentación derivado del epitelio, angiotensina, péptidos laminina, péptidos fibronectina, inhibidores del activador del plasminogen, inhibidores de la metaloproteinasas, interferones, interleucina 12, factor plaquetario 4, IP-10, Gro- $\beta$ , trombospondina, 2-metoxioestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, pentosan polisulfato, angiopoietina 2, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, Docetaxel, poliaminas, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de quinasa, un péptido de señalización, accutina, cidofovir, vincristine, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4, minociclina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio hemopexin del terminal C de la matriz metaloproteinasas-2, el dominio kringle 5 del plasminogen humano, una proteína de fusión de endostatina y angiostatina, una proteína de fusión de endostatina y el dominio kringle 5 del plasminogen humano, el inducido con monocina por el interferón gamma (Mig), una proteína de fusión de Mig y IP10, FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 tipo aletas), o receptor de dominio inserto quinasa (KDR).

20

18. El péptido aislado de la reivindicación 13, en donde dicha molécula es una citocina seleccionada del grupo que consiste de interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferón- $\gamma$  (IF- $\gamma$ ), IF- $\alpha$ , IF- $\beta$ , un factor de necrosis tumoral, o GM-CSF (factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos).

25

19. El péptido aislado de la reivindicación 10, en donde dicho péptido está adherido a un complejo macromolecular.

20. El péptido aislado de la reivindicación 19, en donde dicho complejo es un virus, un bacteriófago, una bacteria, un liposoma, una micropartícula, una perla magnética, una célula de levadura, o una célula de mamífero.

21. El péptido aislado de la reivindicación 13, en donde dicho péptido está adherido a un virus.

22. El péptido aislado de la reivindicación 14, en donde dicho virus es un lentivirus, papovavirus, adenovirus, retrovirus, AAV, vaccinia virus o virus del herpes.

5 23. El péptido aislado de la reivindicación 19, en donde dicho péptido está adherido a un soporte sólido.

24. El péptido aislado de la reivindicación 23, en donde el soporte sólido es una placa con múltiples pocillos o microchip.

10

25. Un método para preparar un constructo que comprende obtener un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y adherir el péptido a una molécula para preparar el constructo.

15 26. Un método para señalizar la administración de un péptido, molécula o proteína a las células que expresan la CRKL, en donde el método comprende los pasos de:

(a) obtener un péptido de acuerdo con la reivindicación 1; y

(b) administrar el péptido a una población de células, en donde la población incluye células que expresan la CRKL, para así administrar la molécula o proteína a dichas  
20 células.

27. El método de la reivindicación 26, en donde las células que expresan la CRKL están en un sujeto, el constructo de fusión de péptido o proteína es formulado en una composición farmacéuticamente aceptable y la composición es administrada al sujeto.

25

28. El método de la reivindicación 27, en donde el sujeto es un sujeto humano.

29. El método de la reivindicación 26, en donde el método se define además como un método de detección y el método comprende además la detección del péptido, molécula o  
30 proteína que se ha administrado a las células.

27

30. El método de la reivindicación 26, en donde el sujeto tiene una enfermedad o trastorno y el método se define además como un método terapéutico.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el sujeto tiene cáncer.

5

32. El método de la reivindicación 31, en donde el cáncer es seleccionado del grupo que cánceres de próstata, seno, sarcoma, encía, lengua, pulmón, piel, hígado, riñón, ojo, cerebro, leucemia, mesotelioma, neuroblastoma, cabeza, cuello, pancreático, renal, de hueso, testicular, ovárico, mesotelioma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebro, colon y vejiga.

10

33. El método de la reivindicación 32, en donde el cáncer es cáncer de próstata.

34. El método de la reivindicación 32, en donde el cáncer es cáncer de seno.

15

35. El método de la reivindicación 32, en donde el cáncer es sarcoma.

36. El método de la reivindicación 1, en donde dicha unidad se define además como que tiene una longitud de 6 a 10 aminoácidos.

20

37. El método de la reivindicación 1, en donde dicha unidad se define además como que tiene una longitud de 14 a 20 aminoácidos.

### **Péptidos de Señalización de la CRKL**

#### **RESUMEN**

[00152] Se proporcionan métodos y composiciones para señalar  
5 selectivamente la CRKL a través del uso de péptidos de señalización. La señalización selectiva de la CRKL secretada a través del uso de un péptido de señalización puede usarse, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer para administrar un compuesto quimioterapéutico, una proteína de fusión, o un constructo de fusión a una célula o tejido canceroso.

P-2779 listado de secuencias modificado  
LISTA DE SECUENCIAS

<110> ARAP, WADIH  
MINTZ, PAUL J.  
PASQUALINI, RENATA

<120> PÉPTIDOS DIRIGIDOS A LA CRKL

<130> UTSC.P0985US

<140> 13/000,231

<141> 2010-12-20

<150> 61/074,423

<151> 2008-06-20

<160> 124

<170> Patente En versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Arg Cys Thr Leu Asn Ser Pro Phe Phe Trp Glu Asp Met Thr His  
1 5 10 15

Glu Cys His Ala  
20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Gly Cys Met Ala Ser Met Leu Arg Glu Phe Glu Gly Ala Thr His  
1 5 10 15

Ala Cys Thr Gln  
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Gly Cys Thr Glu Ala Ala Gly Leu Val Ile Gly Ile Thr Thr His  
1 5 10 15

Gln Cys Gly Asn  
20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Gly Cys Asn His Pro Ser Pro Leu Gly Ser Thr Val Val Pro Thr  
1 5 10 15

Tyr Cys Phe Lys  
20

P-2779 listado de secuencias modificado

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Thr Cys Pro Arg Gln Phe Phe His Met Gln Glu Phe Trp Pro Ser  
 1 5 10 15

Asp Cys Ser Arg  
 20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Arg Cys Val Leu Val Arg Pro Glu Phe Gly Arg Gly Asp Ala Arg  
 1 5 10 15

Leu Cys His Ser  
 20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Gly Cys Ser Asp Ile Met Asn Thr Ala Ala Glu Arg Val Thr Gly  
 1 5 10 15

Asp Cys Ser Tyr  
 20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Val Phe Cys Cys Gly Ser Tyr Cys Gly Gly Val Glu Met Leu Ala Ser  
 1 5 10 15

Arg Cys Gly His  
 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Glu Cys Gly Arg Thr Val His Arg Tyr Pro Trp Gly Ser Pro Glu  
 1 5 10 15

Ser Cys Glu Arg  
 20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT

P-2779 listado de secuencias modificado

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ala Cys Ser Arg Phe Leu Gly Glu Arg Val Asp Ala Thr Ala Ala  
1 5 10 15

Gly Cys Ser Arg  
20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Asn Cys Met Gly Leu Gln Val Ser Glu Leu Phe Met Gly Pro Tyr  
1 5 10 15

Lys Cys Arg Gln  
20

<210> 12

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala  
1 5 10 15

Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly  
20 25 30

Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys  
35 40 45

Gly Cys Pro  
50

<210> 13

<211> 798

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys  
1 5 10 15

Cys Val Phe Ala Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala  
20 25 30

Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys  
35 40 45

Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys  
50 55 60

Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile  
65 70 75 80

Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr  
85 90 95

P-2779 listado de secuencias modificado

Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr  
 100 105 110  
 Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp  
 130 135 140  
 Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val  
 180 185 190  
 Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr  
 195 200 205  
 Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met  
 245 250 255  
 Gln Val Ala Val Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg  
 260 265 270  
 Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly  
 275 280 285  
 Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu  
 290 295 300  
 Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala  
 305 310 315 320  
 His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala  
 325 330 335  
 Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile  
 340 345 350  
 Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile  
 355 360 365  
 Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr  
 385 390 395 400  
 Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser

P-2779 listado de secuencias modificado

405 Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser  
 420 425 430  
 Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu  
 435 440 445  
 Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys  
 450 455 460  
 Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly  
 465 470 475 480  
 Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val  
 485 490 495  
 Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met  
 500 505 510  
 Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn  
 515 520 525  
 Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr  
 530 535 540  
 Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys  
 545 550 555 560  
 Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys  
 565 570 575  
 Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys  
 580 585 590  
 Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn  
 595 600 605  
 Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys  
 610 615 620  
 Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys  
 625 630 635 640  
 Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu  
 645 650 655  
 Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys  
 660 665 670  
 Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val  
 675 680 685  
 Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr  
 690 695 700  
 Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn  
 705 710 715 720

P-2779 listado de secuencias modificado

Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val  
725 730 735

Val Ala Gly Ile Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys  
740 745 750

Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys  
755 760 765

Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys  
770 775 780

Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys  
785 790 795

<210> 14  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Cys Gly Trp Cys Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Cys Asp  
20

<210> 15  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

Cys Thr Trp Cys Gln Lys Leu Asn Phe Thr Gly Pro Gly Asp Pro Asp  
1 5 10 15

Ser Ile Arg Cys Asp  
20

<210> 16  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys  
1 5 10 15

Asp

<210> 17  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

Cys Ala Tyr Cys Thr Asp Glu Met Phe Arg Asp Arg Arg Cys Asn  
1 5 10 15

<210> 18  
<211> 20  
<212> PRT

P-2779 listado de secuencias modificado

<213> Homo sapiens

<400> 18

Cys Ala Trp Cys Ser Lys Glu Asp Phe Gly Ser Pro Arg Ser Ile Thr  
1 5 10 15

Ser Arg Cys Asp  
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Cys Ala Trp Cys Ala Gln Glu Asn Phe Thr His Pro Ser Gly Val Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Cys Asp  
20

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Cys Ala Trp Cys Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu  
1 5 10 15

Ala Arg Arg Cys Ala  
20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Ile Ser Gly Gly Ser Arg Ser  
1 5 10 15

Glu Arg Cys Asp  
20

<210> 22

<211> 303

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Ser Ser Ala Arg Phe Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Trp Tyr Met  
1 5 10 15

Gly Pro Val Ser Arg Gln Glu Ala Gln Thr Arg Leu Gln Gly Gln Arg  
20 25 30

His Gly Met Phe Leu Val Arg Asp Ser Ser Thr Cys Pro Gly Asp Tyr  
35 40 45

Val Leu Ser Val Ser Glu Asn Ser Arg Val Ser His Tyr Ile Ile Asn  
50 55 60

P-2779 listado de secuencias modificado

Ser Leu Pro Asn Arg Arg Phe Lys Ile Gly Asp Gln Glu Phe Asp His  
65 70 75 80

Leu Pro Ala Leu Leu Glu Phe Tyr Lys Ile His Tyr Leu Asp Thr Thr  
85 90 95

Thr Leu Ile Glu Pro Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Pro Pro Met Gly Ser  
100 105 110

Val Ser Ala Pro Asn Leu Pro Thr Ala Glu Asp Asn Leu Glu Tyr Val  
115 120 125

Arg Thr Leu Tyr Asp Phe Pro Gly Asn Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe  
130 135 140

Lys Lys Gly Glu Ile Leu Val Ile Ile Glu Lys Pro Glu Glu Gln Trp  
145 150 155 160

Trp Ser Ala Arg Asn Lys Asp Gly Arg Val Gly Met Ile Pro Val Pro  
165 170 175

Tyr Val Glu Lys Leu Val Arg Ser Ser Pro His Gly Lys His Gly Asn  
180 185 190

Arg Asn Ser Asn Ser Tyr Gly Ile Pro Glu Pro Ala His Ala Tyr Ala  
195 200 205

Gln Pro Gln Thr Thr Thr Pro Leu Pro Ala Val Ser Gly Ser Pro Gly  
210 215 220

Ala Ala Ile Thr Pro Leu Pro Ser Thr Gln Asn Gly Pro Val Phe Ala  
225 230 235 240

Lys Ala Ile Gln Lys Arg Val Pro Cys Ala Tyr Asp Lys Thr Ala Leu  
245 250 255

Ala Leu Glu Val Gly Asp Ile Val Lys Val Thr Arg Met Asn Ile Asn  
260 265 270

Gly Gln Trp Glu Gly Glu Val Asn Gly Arg Lys Gly Leu Phe Pro Phe  
275 280 285

Thr His Val Lys Ile Phe Asp Pro Gln Asn Pro Asp Glu Asn Glu  
290 295 300

<210> 23  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala  
1 5 10

<210> 24  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

P-2779 listado de secuencias modificado

Gly Pro Val Phe Ala Lys Ala Ile Gln Lys Arg Val Pro Cys Ala Tyr  
1 5 10 15

Asp Lys Thr Ala Leu Ala Leu Glu Val Gly Asp Ile Val Lys Val Thr  
20 25 30

Arg Met Asn Ile Asn Gly Gln Trp Glu Gly Glu Val Asn Gly Arg Lys  
35 40 45

Gly Leu Phe Pro Phe Thr His Val Lys Ile  
50 55

<210> 25  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

Tyr Arg Cys Thr Leu Asn Ser Ala Phe Phe Trp Glu Asp Met Thr His  
1 5 10 15

Glu Cys His Ala  
20

<210> 26  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26

Tyr Arg Phe Cys Thr Ser Pro Phe His Glu Trp His Leu Glu Asn Thr  
1 5 10 15

Asp Met Cys Ala  
20

<210> 27  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27

Tyr Arg Glu Cys Thr Asp Ser Pro His Glu Phe His Leu Trp Asn Thr  
1 5 10 15

Met Cys Ala Phe  
20

<210> 28  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28

Tyr Arg Cys Thr Leu Asn Ser Pro Ala Ala Ala Glu Asp Met Thr His  
1 5 10 15

Glu Cys His Ala  
20

<210> 29  
<211> 20  
<212> PRT

P-2779 listado de secuencias modificado

<213> Homo sapiens

<400> 29

Tyr Arg Cys Glu Thr Asp Ser Pro His Glu Phe His Leu Trp Asn Thr  
1 5 10 15

Met Cys Ala Phe  
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Tyr Arg Cys Glu Thr Asp Ser Pro His Glu Phe His Leu Trp Asn Thr  
1 5 10 15

Phe Cys Ala Met  
20

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cacagagctc aacaccatgt cctccgccag gttcg

35

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

cacactcgag ctcgttttca tctgggtttt gaggg

35

<210> 34

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

cacagagctc gccaccatgt cctccgccag gttcgactcc t

41

<210> 35

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

cacactcgag ttccagggtta tcttctgctg taggc

35

<210> 36

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

89

P-2779 listado de secuencias modificado

|                                                             |  |    |
|-------------------------------------------------------------|--|----|
| <400> 36                                                    |  |    |
| cacagagctc gccaccatgg gatctgtctc agcacccaac c               |  | 41 |
| <210> 37                                                    |  |    |
| <211> 35                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 37                                                    |  |    |
| cacactcgag attctgtgtg gatggcaaag ggggtg                     |  | 35 |
| <210> 38                                                    |  |    |
| <211> 44                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 38                                                    |  |    |
| cacagagctc gccaccatga gatcctcacc acacggaaag catg            |  | 44 |
| <210> 39                                                    |  |    |
| <211> 34                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 39                                                    |  |    |
| cacactcgag gttttcatct gggttttgag ggtc                       |  | 34 |
| <210> 40                                                    |  |    |
| <211> 50                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 40                                                    |  |    |
| cacccctttg ccatccacac agaatttggc attagagggtt ggtgacatcg     |  | 50 |
| <210> 41                                                    |  |    |
| <211> 50                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 41                                                    |  |    |
| cgatgtcacc aacctctaata gccaaattct gtgtggatgg caaaggggtg     |  | 50 |
| <210> 42                                                    |  |    |
| <211> 48                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 42                                                    |  |    |
| ccctgtgctt atgacaagac tgccgaaggc gaagtgaacg ggcgcaaa        |  | 48 |
| <210> 43                                                    |  |    |
| <211> 48                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 43                                                    |  |    |
| tttgcgcccg ttcacttcgc cttcggcagt cttgtcataa gcacaggg        |  | 48 |
| <210> 44                                                    |  |    |
| <211> 54                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |
| <213> Homo sapiens                                          |  |    |
| <400> 44                                                    |  |    |
| caaggatgaa tataaatggc cagtggtttg accctcaaaa cccagatgaa aacg |  | 54 |
| <210> 45                                                    |  |    |
| <211> 54                                                    |  |    |
| <212> DNA                                                   |  |    |

P-2779 listado de secuencias modificado

<213> Homo sapiens

<400> 45  
cgttttcatc tgggttttga ggggtcaaacc actggccatt tatattcatc cttg 54

<210> 46  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 46  
caccctttg ccatccacac agaattttga ccttcaaac ccagatgaaa acg 53

<210> 47  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 47  
cgttttcatc tgggttttga ggggtcaaat tctgtgtgga tggcaaaggg gtg 53

<210> 48  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 48  
cacagagctc gccacatga atttacaacc aattttctgg 40

<210> 49  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 49  
cacactcgag tggttccttg ctacggttgg ttac 34

<210> 50  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 50  
catgggcgaa ttcacaaatt caacattttt acaggaagga atgcctactt ctgcacgac 59

<210> 51  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 51  
tcgagtcgtg cagaagtagg cattccttcc tgtaaaaatg ttgaatttgt gaattcgcc 59

<210> 52  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 52  
cacaccatgg gcgaattctg tttaaaagca aatgccaaat catg 44

<210> 53  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 53  
cacactcgag gcaacccttc tttttaagg cttc 34

<210> 54

P-2779 listado de secuencias modificado

|       |                         |    |
|-------|-------------------------|----|
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 54                      |    |
|       | gucguauugu caaagaguat t | 21 |
| <210> | 55                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 55                      |    |
|       | guagcagaca acacacaaat t | 21 |
| <210> | 56                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 56                      |    |
|       | cagcagaccu agaaauguat t | 21 |
| <210> | 57                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 57                      |    |
|       | ccgaagaccu gcccuuaau u  | 21 |
| <210> | 58                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | RNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 58                      |    |
|       | gaagauaacc uggaauaugu u | 21 |
| <210> | 59                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 59                      |    |
|       | gucacaagga ugaauuaau u  | 21 |
| <210> | 60                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 60                      |    |
|       | aauggaauu ccaacaguuu u  | 21 |
| <210> | 61                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 61                      |    |
|       | gguaucacag cccaccaut t  | 21 |
| <210> | 62                      |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | Homo sapiens            |    |
| <400> | 62                      |    |
|       | ggaugaauau aaauggccat t | 21 |

P-2779 listado de secuencias modificado

```
<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 63  
gagaugaggu ucaauuugat t 21

```
<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 64  
gaugagguuc aaauugaaat t 21

```
<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 65  
guacagaucc gaaguuucac t 21

```
<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 66  
auggaacguga auugcucaau u 21

|       |              |
|-------|--------------|
| <210> | 67           |
| <211> | 22           |
| <212> | PRT          |
| <213> | Homo sapiens |

<400> 67

Tyr Arg Cys Thr Leu Asn Ser Pro Phe Phe Trp Glu Asp Met Thr His  
1 5 10 15

Glu Cys His Ala Gly Gly  
20

```
<210> 68
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 68  
gtgagccggc tgccc 15

```
<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 69  
ttcggcccca gcggc 15

```
<210> 70
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 70

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
1 5 10

P-2779 listado de secuencias modificado

<210> 71  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71

Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala  
1 5 10

<210> 72  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala  
1 5 10

<210> 73  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Lys Leu Gly  
20

<210> 74  
<211> 49  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

Cys Leu Lys Ala Asn Ala Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly  
1 5 10 15

Pro Asn Cys Gly Trp Cys Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met  
20 25 30

Pro Thr Ser Ala Arg Cys Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly  
35 40 45

Cys

<210> 75  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg  
1 5 10 15

<210> 76  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76

P-2779 listado de secuencias modificado

Cys Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg  
1 5 10 15

Cys

<210> 77  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

Cys Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Cys  
1 5 10 15

<210> 78  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78

His Thr Cys Trp Gly Ala Arg Asp Val Ala Gln Pro Ser Gly Thr Val  
1 5 10 15

Arg Cys Leu Lys  
20

<210> 79  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 79

Thr Ser Cys Val Arg Thr Gly His Asp Glu Asn Leu Leu Lys Ala Ala  
1 5 10 15

Tyr Cys Ser Ser  
20

<210> 80  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80

Val Ala Cys Asp Ile Ser Ala Val Glu Arg Leu Pro Ala Ser Ala Arg  
1 5 10 15

Ser Cys Lys Thr  
20

<210> 81  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81

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

Val Cys Asp Gln  
20

95

P-2779 listado de secuencias modificado

<210> 82  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 82

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

Ser Cys Ala Leu  
 20

<210> 83  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Tyr Arg Cys Thr Leu Asn Ser Pro Phe Phe Trp Glu Asp Met Thr His  
 1 5 10 15

Glu Cys His Ala  
 20

<210> 84  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Lys Leu Cys Tyr Arg Ser Ser Ala Gly Ser Glu Leu Arg Pro Pro Glu  
 1 5 10 15

Lys Cys Ala Tyr  
 20

<210> 85  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 85

Val Arg Cys Asn Glu Ala Gln Leu Gln Asp Ser Gly Thr Val Pro His  
 1 5 10 15

Pro Cys Leu Arg  
 20

<210> 86  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Arg Thr Cys Glu Glu Val Arg Asn Arg Ala Leu Glu Glu Leu Thr Asn  
 1 5 10 15

Phe Cys Pro Tyr  
 20

<210> 87  
 <211> 20  
 <212> PRT

P-2779 listado de secuencias modificado

<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Arg Cys Pro Leu Glu Val Asp Arg Pro Asn Arg Asp Pro Ala Phe  
1 5 10 15

Leu Cys Ser Gln  
20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Asn Arg Cys Met Pro Gly Phe Leu Asp Asp Ala Asp Ser Ala Ala Ser  
1 5 10 15

Pro Cys Gly Ser  
20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gly Asn Cys Met Gly Leu Gln Val Ser Glu Leu Phe Met Gly Pro Tyr  
1 5 10 15

Lys Cys Arg Gln  
20

<210> 90

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Ser Arg Cys His Ala Leu Arg Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Cys Ile Ser  
20

<210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Arg Ser Cys Val Asn Ser Asp Thr Gly Val Leu Gln Arg Gly Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Cys Leu Phe  
20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

97

P-2779 listado de secuencias modificado

Gln His Cys Val Lys Gly Gln Phe Pro Phe Arg Glu Ser Val Thr Ile  
1 5 10 15

Thr Cys Asn Ser  
20

<210> 93  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 93

Met His Cys Thr Ser Gln Thr Leu Arg Gly Thr Pro Ser Leu Ala Pro  
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp  
20

<210> 94  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 94

Tyr Ser Cys Thr Arg Leu Asn Gly Thr Gly Leu Gln Asn Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Ala Cys Asp Arg  
20

<210> 95  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 95

Arg Gly Cys Trp Arg Asp Ser Thr Ala Trp His Val Ser Tyr Pro Val  
1 5 10 15

Glu Cys Leu Ala  
20

<210> 96  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 96

Thr Leu Cys Arg Ser Leu Glu His Glu Val Gly Leu Phe Lys Pro Arg  
1 5 10 15

Glu Cys Pro Phe  
20

<210> 97  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 97

Val Val Cys Phe Met Glu Arg Gln Met Gly Thr Asp Val Val Ser Pro  
1 5 10 15

98

P-2779 listado de secuencias modificado

Met Cys Val Asn  
20

<210> 98  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 98

Trp Val Cys Thr Ser Ala Ser Gln Asp Thr Arg Leu Lys Glu Pro Gly  
1 5 10 15

Met Cys Ile Ala  
20

<210> 99  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 99

Pro Asn Cys Asp Leu Asp Asp Ile Val Leu Asn Pro Tyr Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Pro Cys Gly Thr  
20

<210> 100  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 100

Pro Gly Cys Val Val Ser Pro Phe Ala Leu Ser Ala Gln Gly Thr Ser  
1 5 10 15

Val Cys Thr Ile  
20

<210> 101  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 101

Arg Gly Cys Thr Glu Ala Ala Gly Leu Val Ile Gly Ile Thr Thr His  
1 5 10 15

Gln Cys Gly Asn  
20

<210> 102  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 102

Val Phe Cys Cys Gly Ser Tyr Cys Gly Gly Val Glu Met Leu Ala Ser  
1 5 10 15

Arg Cys Gly His  
20

P-2779 listado de secuencias modificado

<210> 103  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 103

Gly Asp Cys Glu Thr Asn Asn Val Thr Lys Val Gly Gly Ile Thr Arg  
 1 5 10 15

Asn Cys Val Gly  
 20

<210> 104  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 104

Thr Thr Cys Asn Lys Ser Met Ser Ser Gln Pro Met Arg Asp Ser Arg  
 1 5 10 15

Glu Cys His Arg  
 20

<210> 105  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 105

Glu Gly Cys Ser Asp Ile Met Asn Thr Ala Ala Glu Arg Val Thr Gly  
 1 5 10 15

Asp Cys Ser Tyr  
 20

<210> 106  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 106

Lys Ile Cys Pro Val Thr Asn Met Trp Thr Thr Pro Ser Trp Ala His  
 1 5 10 15

Lys Cys Gly Met  
 20

<210> 107  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 107

Asn Asn Cys Pro Val Glu Gly Ser Gln Gln Asn Tyr Ser Gly Ala Thr  
 1 5 10 15

Trp Cys Arg Ala  
 20

<210> 108  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

100

P-2779 listado de secuencias modificado

<400> 108

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

Ala Cys Val Thr  
20

<210> 109  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 109

Thr Glu Cys Arg Gly Ala Ser Ser Gly Ser Val Ser Gly Ala Ala Thr  
1 5 10 15

Asp Cys Arg Asp  
20

<210> 110  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 110

Ala Arg Cys Arg Glu Asp Thr Gly Phe Met Gly Leu Gly Ser Ala Asn  
1 5 10 15

Ile Cys Thr Asp  
20

<210> 111  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 111

Asn Asp Cys Ser Ala His Ala Gln Pro Gly Trp Asp Glu Val Pro Pro  
1 5 10 15

Met Cys Asn Gln  
20

<210> 112  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 112

Thr Leu Cys Pro Pro Ala Ser Met Gly Leu Gly Arg Glu Lys Pro Arg  
1 5 10 15

Leu Cys Ser Val  
20

<210> 113  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 113

Arg Glu Cys Gly Arg Thr Val His Arg Tyr Pro Trp Gly Ser Pro Glu  
Página 22

101

P-2779 listado de secuencias modificado

1 5 10 15

Ser Cys Glu Arg  
20

<210> 114  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 114

Leu Gly Cys Met Ala Ser Met Leu Arg Glu Phe Glu Gly Ala Thr His  
1 5 10 15

Ala Cys Thr Gln  
20

<210> 115  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 115

Asp Arg Cys Val Leu Val Arg Pro Glu Phe Gly Arg Gly Asp Ala Arg  
1 5 10 15

Leu Cys His Ser  
20

<210> 116  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 116

Val Glu Cys Val Met Ala Ser Ala Ser Thr Asp Gly Thr Ala Ala His  
1 5 10 15

Pro Cys Lys Pro  
20

<210> 117  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 117

Asp Ala Cys Ser Arg Phe Leu Gly Glu Arg Val Asp Ala Thr Ala Ala  
1 5 10 15

Gly Cys Ser Arg  
20

<210> 118  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 118

Asn Gln Cys Ser Ser Leu Leu Thr Tyr Gln Gly Trp Lys Arg Thr Lys  
1 5 10 15

Asp Cys Ile Pro

102

P-2779 listado de secuencias modificado

20

<210> 119  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 119

Lys Ser Cys Gly Lys Tyr Gly Leu Ile Val Gly Gln Pro Phe Ala Glu  
1 5 10 15

His Cys Pro Pro  
20

<210> 120  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 120

Gly Thr Cys Pro Arg Gln Phe Phe His Met Gln Glu Phe Trp Pro Ser  
1 5 10 15

Asp Cys Ser Arg  
20

<210> 121  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 121

Pro Asn Cys Tyr Ser Gly Asp Gly Glu Ile Ser Ser His Ile Pro Val  
1 5 10 15

Gln Cys Leu Met  
20

<210> 122  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 122

Gly Tyr Cys Leu Thr Val Val Gly Gly Ala Val Leu Thr Ile Ala Leu  
1 5 10 15

Leu Cys Val Thr  
20

<210> 123  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 123

Ile Gly Cys Asn His Pro Ser Pro Leu Gly Ser Thr Val Val Pro Thr  
1 5 10 15

Tyr Cys Phe Lys  
20

<210> 124

103

P-2779 listado de secuencias modificado

<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(16)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(19)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 124

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Cys Xaa Xaa