



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-43820

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

AGENTES DE TRANSPORTE DERIVADOS DE CUPREDOXINAS

Y METODOS DE UTILIZAR LOS MISMOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

ANANDA CHAKRABARTY, TAPAS DAS GUPTA, TOHRU YAMADA,
ARSENIO FIALHO.

DOMICILIO

ILLINOIS 60181, ILLINOIS 60305, ILLINOIS 60304, U.S.A. y
1500-401 LISBOA, PORTUGAL.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

FW, 07-05-2001

Polo, Leon, Arce

(FORMA P-10)



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-043820- -00000-0000

Fecha: 2007-05-03 18:00:22 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 195

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ANANDA CHAKRABARTY,
TAPAS DAS GUPTA,
TOHRU YAMADA,
ARSENIO FIALHO,

Ciudadanos estadounidenses, japonés y
portugués respectivamente.

Dirección: 206 Julia Drive,
Villa Park,
Illinois 60181,
Estados Unidos de América

1317 Jackson Avenue,
River Forest,
Illinois 60305,
Estados Unidos de América

903 South Cuyler Avenue, Apt. 2,
Oak Park,
Illinois 60304,
Estados Unidos de América

Praceta Maestro Ivo Cruz,
Lote 23 3 Esq.
1500-401 Lisboa,
Portugal

Domicilios: Villa Park,
Illinois 60181,
Estados Unidos de América

River Forest,
Illinois 60305,
Estados Unidos de América

Oak Park,
Illinois 60304,
Estados Unidos de América

1500-401 Lisboa,
Portugal

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: <u>clientes@camyp.com</u> Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>438.019</u> T.P <u>31.929</u>				
4 INVENTOR (ES) (72)	<table border="0"><tr><td data-bbox="446 497 966 658">1. Ananda CHAKRABARTY 206 Julia Drive, Villa Park, Illinois 60181, Estados Unidos de América</td><td data-bbox="982 497 1502 658">2. Tapas DAS GUPTA 1317 Jackson Avenue, River Forest, Illinois 60305, Estados Unidos de América</td></tr><tr><td data-bbox="446 712 966 873">3. Tohru YAMADA 903 South Cuyler Avenue, Apt. 2, Oak Park, Illinois 60304, Estados Unidos de América</td><td data-bbox="982 712 1502 873">4. Aresenio FIALHO Praceta Maestro Ivo Cruz, Lote 23 3 Esq. 1500-401 Lisboa, Portugal</td></tr></table>		1. Ananda CHAKRABARTY 206 Julia Drive, Villa Park, Illinois 60181, Estados Unidos de América	2. Tapas DAS GUPTA 1317 Jackson Avenue, River Forest, Illinois 60305, Estados Unidos de América	3. Tohru YAMADA 903 South Cuyler Avenue, Apt. 2, Oak Park, Illinois 60304, Estados Unidos de América	4. Aresenio FIALHO Praceta Maestro Ivo Cruz, Lote 23 3 Esq. 1500-401 Lisboa, Portugal
1. Ananda CHAKRABARTY 206 Julia Drive, Villa Park, Illinois 60181, Estados Unidos de América	2. Tapas DAS GUPTA 1317 Jackson Avenue, River Forest, Illinois 60305, Estados Unidos de América					
3. Tohru YAMADA 903 South Cuyler Avenue, Apt. 2, Oak Park, Illinois 60304, Estados Unidos de América	4. Aresenio FIALHO Praceta Maestro Ivo Cruz, Lote 23 3 Esq. 1500-401 Lisboa, Portugal					
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/035758</u> Fecha: <u>6 de octubre de 2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/088508 A2</u> Fecha: <u>24 de agosto de 2006</u>						
6 Título (54) <u>AGENTES DE TRANSPORTE DERIVADOS DE CUPREDOXINAS Y METODOS DE UTILIZAR LOS MISMOS.</u>						
7 Clasificación Internacional (51) <u>C07K 14/195</u>						
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u> <u>US</u> <u>US</u>	(32) Fecha <u>7 de octubre de 2004</u> <u>13 de mayo de 2005</u> <u>19 de julio de 2005</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/616.782</u> <u>60/680.500</u> <u>60/700.297</u>			
9 Comprobante de pago No.: <u>07-30.142</u> Fecha: <u>16 de abril de 2007</u>						

10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$482.000.00
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

N MBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

MGT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/088508 A2

Descripción:

Páginas 56 en el idioma original

Páginas 58 en español

Reivindicaciones: Número (s) 36

Figuras: Número (s) 10

2. ☒ Listado de Secuencias

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 August 2006 (24.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/088508 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/295 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/03578

(22) International Filing Date: 6 October 2005 (06.10.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Dates:
60616,782 7 October 2004 (07.10.2004) US
60680,900 13 May 2005 (13.05.2005) US
60700,297 19 July 2005 (19.07.2005) US

(71) Applicants and

(72) Inventors: CHAKRABARTY, Ananda (US/US); 206 Ju-
lia Drive, Villa Park, Illinois 60181 (US). DAS GUPTA,
Tapas (US/US); 1317 Jackson Avenue, River Forest, Illi-
nois 60305 (US). YAMADA, Tetsu (JP/US); 903 South
Coryell Avenue, Apt. 2, Oak Park, Illinois 60304 (US). FI-
ALHO, Aronimo (FI/PT); Praca Mestre Ivo Cruz, Lote
23 3 Bq, P-1500-401 Lisbon (PT).

(74) Agents: PELITO, Don et al.; Preston Gates Ellis & Rouve-
las Menden LLP, 1735 New York Avenue, Suite 500, Wash-
ington, DC 20006 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AR, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR,
KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/088508 A2

(54) Title: CUPREDOXIN DERIVED TRANSPORT AGENTS AND METHODS OF USE THEREOF



(57) Abstract: The present invention discloses methods and materials for delivering a cargo compound into a cancer cell. Delivery of the cargo compound is accomplished by the use of protein transduction domains derived from cupredoxin. The invention further discloses methods for treating cancer and diagnosing cancer.

6

CUPREDOXIN DERIVED TRANSPORT AGENTS AND METHODS OF USE THEREOF

RELATED APPLICATIONS

5 This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/616,782, filed October 7, 2004, U.S. Provisional Patent Application No. 60/680,500, filed May 13, 2005, and U.S. Provisional Patent Application No. 60/700,297, filed July 19, 2005. The entire content of those applications are fully incorporated herein by reference.

10

STATEMENT OF GOVERNMENTAL INTEREST

 The subject matter of this application has been supported by a research grant from the National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, U.S.A., (Grant Number ES 04050-18). The government may have certain rights in this
15 invention.

BACKGROUND

 The entry of a protein into a mammalian cell is often dictated by a small segment of the protein, which is commonly referred to as a "protein transduction
20 domain" or PTD. This segment can be used as a signal attached to a foreign protein to facilitate transport of such a protein into a mammalian cell. For example, amphipathic peptides are used to facilitate uptake of DNA-cleaving metalloporphyrins as potential antitumor drugs in human fibroblasts HS68 or murine lymphocytic leukemia L1210 cells (Chaloin, L. *et al.* Bioconjugate Chem.
25 12:691-700, (2001)). Peptides, called cell-penetrating peptides, such as penetratin, transportan, Tat (amino acids 47-57 or 48-60) and the model amphipathic peptide MAP, have been used as delivery vehicles for transporting pharmacologically important substances, such as antisense oligonucleotides, proteins and peptides

(Hallbrink, M. *et al.* Biochim. Biophys. Acta 1515:101-109 (2001); Lindgren, M., *et al.* Trends Pharmacol. Sci. 21:99-103 (2000)).

Such peptides, particularly the DNA-binding homeodomain of *Antennapedia*, a *Drosophila* transcription factor, or the 21 residue peptide carrier Pep-1, are internalized by many types of cells in culture, such as human HS68 or murine NIH-3T3 fibroblasts, at either 37°C or 4 °C. The lack of effect of the temperature shift suggests a penetration mechanism different from that of classical endocytosis (Morris, M.C. *et al.* Nature Biotechnol. 19:1173-1176 (2001)), which requires chiral receptor proteins. One of the most widely used peptides to transport pharmacologically-active compounds in mammalian cells is the eleven amino acid arginine-rich protein transduction domain (PTD) of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transactivator protein Tat (Schwarze, S.R. *et al.* Science 285:1569-1572 (1999), Schwarze, S.R. *et al.* Trends Cell Biol. 10:290-295 (2000)). Intraperitoneal injection of the 120 kDa beta-galactosidase/Tat fusion protein results in the transcellular transduction of the fusion protein into virtually all tissues in mice, including the passage of the blood-brain barrier. This short peptide domain of HIV-1 Tat has been shown to mediate cell internalization of large molecules or particles, including magnetic nanoparticles, phage vectors, liposomes and plasmid DNA. Unlike the other cell-penetrating peptides discussed above, internalization of cargo proteins by full length Tat or its 11 amino acid transduction domain is significantly impaired at 4°C (Liu, Y. *et al.* Nat. Med. 6:1380-1387 (2000), Suzuki, T. *et al.* J. Biol. Chem. 277:2437-2443 (2002)) and requires interactions with receptors such as the heparan sulfate chains of the cell membrane heparan sulfate proteoglycans.

Most of the PTDs identified to date have been derived from viral and mammalian sources. Other sources of PTDs would be desirable for the design of various experimental sequences, and for animal and human therapies and prophylactic procedures. One alternative source of PTDs is bacterial cells. Although bacterial proteins such as cholera toxin are known to enter mammalian cell cytosol (Sofer, A. and Futerman, A.H. J. Biol. Chem. 270:12117-12122 (1995)), the cytotoxicity of such proteins has limited the use of bacterial proteins,

or PTDs derived from them, for transporting pharmacologically important cargos in mammalian cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 One aspect of the present invention is peptide that has at least about 90% amino acid sequence identity to less than a full length wild-type cupredoxin or H.8 outer membrane protein, and which facilitates the entry of an linked cargo molecule into a mammalian cancer cell. In some embodiments, the peptide has at least about 90% amino acid sequence identity to less than a full length azurin, 10 plastocyanin, rusticyanin, pseudoazurin, auracyanin or azurin-like protein, or to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 and SEQ ID NO: 43. In some embodiments, the peptide is derived from *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Thiobacillus* 15 *ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Chloroflexus aurantiacus* and *Neisseria gonorrhoeae*. In other embodiments, the peptide is at least 10 residues and not more than 50 residues in length. In some embodiments, the peptide comprises a sequence which has at 20 least about 90% amino acid sequence identity to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 or SEQ ID NO: 47. In other embodiments, the peptide comprises or consists of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, 25 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 or SEQ ID NO: 47. In some embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence DGXXXXDXXYXKXXD and DGXXXXDXXYXKXXD, where D is aspartic 30 acid, G is glycine, Y is tyrosine, K is lysine and X is any amino acid. Finally, in

some embodiments, the peptide has significant structural homology to the 50-77 amino acid region of *Pseudomonas aeruginosa* azurin.

Another aspect of the invention is a complex comprising a cargo compound and an amino acid sequence, where the amino acid sequence has at least about
5 90% sequence identity with a cupredoxin, or a fragment thereof, the amino acid sequence, or fragment thereof, is linked to the cargo compound, and the amino acid sequence facilitates entry of the cargo compound into a mammalian cancer cell. In some embodiments, the amino acid sequence of this complex has at least about 90% amino acid sequence identity to less than a full length wild-type
10 cupredoxin or H.8 outer membrane protein. In other embodiments, the cargo compound is protein, lipoprotein, polypeptide, peptide, polysaccharide, nucleic acid, dye, microparticle, nanoparticle, toxin and drug. In particular embodiments, the cargo is a protein or polypeptide which is linked amino acid sequence to form a fusion protein. In other particular embodiments, the cargo compound is a toxin,
15 more particularly, the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. In other embodiments, the cargo is a detectable substance, more specifically one detectable by fluorimetry, microscopy, X-ray CT, MRI or ultrasound. Finally, the invention also encompasses the complex in a pharmaceutically suitable carrier.

Another aspect of the present invention is directed to a method for
20 delivering a cargo compound into a cell. In one embodiment, this method comprises contacting a cell or cells with the above complex. In other embodiments, the cell or cells originate from a patient suffering from cancer, and are reintroduced into the patient. In other embodiments, the cells is a cancer cell, more specifically an osteosarcoma cell, lung carcinoma cell, colon carcinoma cell,
25 lymphoma cell, leukemia cell, soft tissue sarcoma cell, breast carcinoma cell, liver carcinoma cell, bladder carcinoma cell or prostate carcinoma cell. In other embodiments, the complex is administered to a patient in a therapeutically effective amount. In other embodiments, the complex is administered intravenously, topically, subcutaneously, intramuscularly or into a tumor. In other
30 embodiments, the complex is co-administered with another cancer treatment.

Another aspect of the invention is a method to diagnose cancer. In some embodiments, the complex with a cargo that is a detectable substance is administered to a patient with cancer and the location of the cargo is detected. In particular embodiments, the cargo compound is an X-ray contrast agent and is detected by X-ray CT, the cargo compound is a magnetic resonance imaging contrast agent and is detected by MRI, and the cargo is an ultrasound contrast agent and is detectable by ultrasound. In other embodiments, the a cell or cells are contacted with a complex with a detectable substance and the location of the cargo is detected.

10 Another aspect of the invention is a kit that contains any of the above complexes. In some embodiments, the kit further comprises a pharmaceutically acceptable adjuvant or excipient. In other embodiments, the kit further comprises a vehicle for administration of the reagent.

15 **BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES**

SEQ ID NO: 1 is the amino acid sequence of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 2 is the amino acid sequence of plastocyanin from *Phormidium laminosum*.

20 SEQ ID NO: 3 is the amino acid sequence of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*.

SEQ ID NO: 4 is the amino acid sequence of pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes*.

25 SEQ ID NO: 5 is the amino acid sequence of the 36-128 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 6 is the amino acid sequence of the 36-89 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 7 is the amino acid sequence of the 36-77 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

30 SEQ ID NO: 8 is the amino acid sequence of the 36-50 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 9 is the amino acid sequence of the 50-77 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 10 is the amino acid sequence of the 50-66 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

5 SEQ ID NO: 11 is the amino acid sequence of the azu 67-77 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 12 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 36-128.

10 SEQ ID NO: 13 is the amino acid sequence of the reverse primer for pGST-azu 36-128.

SEQ ID NO: 14 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 36-50.

SEQ ID NO: 15 is the amino acid sequence of the reverse primer for pGST-azu 36-50.

15 SEQ ID NO: 16 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 36-77.

SEQ ID NO: 17 is the amino acid sequence of the reverse primer for pGST-azu 36-77.

20 SEQ ID NO: 18 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 36-89.

SEQ ID NO: 19 is the amino acid sequence of the reverse primer for pGST-azu 36-89.

SEQ ID NO: 20 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 50-77.

25 SEQ ID NO: 21 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 67-77.

SEQ ID NO: 22 is the amino acid sequence of the reverse primer for pGST-azu 50-77 and pGST-azu 67-77.

30 SEQ ID NO: 23 is the amino acid sequence of the forward primer for pGST-azu 50-66.

SEQ ID NO: 24 is the amino acid sequence of the reverse primer for pGST-azu 50-66.

SEQ ID NO: 25 is the amino acid sequence of the forward primer for the green fluorescent protein gene.

5 SEQ ID NO: 26 is the amino acid sequence of the reverse primer for green fluorescent protein gene.

SEQ ID NO: 27 is the amino acid sequence of the forward primer for gst-gfp-azu 50-77.

10 SEQ ID NO: 28 is the amino acid sequence of the reverse primer for gst-gfp-azu 50-77.

SEQ ID NO: 29 is the amino acid sequence of azurin from *Pseudomonas syringae*.

SEQ ID NO: 30 is the amino acid sequence of azurin/H.8 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*.

15 SEQ ID NO: 31 is the amino acid sequence of the azurin from *Vibrio parahaemolyticus*.

SEQ ID NO: 32 is the amino acid sequence of the azurin from *Bordetella bronchiseptica*.

20 SEQ ID NO: 33 is the amino acid sequence of the auracyanin A from *Chloroflexus aurantiacus*

SEQ ID NO: 34 is the amino acid sequence of the auracyanin B from *Chloroflexus aurantiacus*.

25 SEQ ID NO: 35 is an artificial amino acid sequence representing the conserved residues in the cupredoxin entry domain where D is aspartic acid, G is glycine, Y is tyrosine, K is lysine and X is any amino acid.

SEQ ID NO: 36 is the amino acid sequence of the *Neisseria gonorrhoeae* Laz protein.

SEQ ID NO: 37 is the amino acid sequence of the 50-67 amino acid fragment of wt-azurin from *Pseudomonas aeruginosa*.

30 SEQ ID NO: 38 is the amino acid sequence of the 57-89 amino acid fragment of auracyanin B of *Chloroflexus aurantiacus*.

SEQ ID NO: 39 is the amino acid sequence of the 50-77 amino acid fragment of azurin from *Bordetella pertussis*.

SEQ ID NO: 40 is the amino acid sequence of the 106-132 amino acid fragment of the Laz protein from *Neisseria meningitidis*.

5 SEQ ID NO: 41 is the amino acid sequence of the 53-70 amino acid fragment of azurin from *P. aeruginosa*.

SEQ ID NO: 42 is the amino acid sequence of the 53-64 amino acid fragment of azurin from *P. aeruginosa*.

10 SEQ ID NO: 43 is the amino acid sequence of the azurin from *Bordetella pertussis*.

SEQ ID NO: 44 is the amino acid sequence of the 51-77 amino acid fragment from azurin from *P. aeruginosa*.

SEQ ID NO: 45 is the amino acid sequence of the 51-77 amino acid fragment from azurin from *Pseudomonas syringae*.

15 SEQ ID NO: 46 is the amino acid sequence of the is the 52-78 amino acid fragment from azurin from *Vibrio parahaemolyticus*.

SEQ ID NO: 47 is the amino acid sequence of the 51-77 amino acid fragment from azurin from *Bordetella bronchiseptica*.

20 SEQ ID NO: 48 is an artificial amino acid sequence representing the conserved residues in the cupredoxin entry domain where D is aspartic acid, G is glycine, Y is tyrosine, K is lysine and X is any amino acid.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

25 Figure 1(a) and (b). Graphs showing that entry of azurin correlates with cytotoxicity. (a) MTT assays were performed for the determination of wt-azurin-induced cytotoxicity against J774, UISOMel-2 and fibroblast cells. (b) Analysis of cell cycle progression in human normal fibroblast cells treated with M44KM64E mutant azurin. Fibroblast cells were incubated with 0 (control), 0.5 or 1.0 mg/ml of mutant azurin for 24 hr. At the end of the treatment, DNA content
30 in the cells was determined by flow cytometry.

Figure 2 (a) and (b). (a) Schematic representation of various truncated azurin constructs and their purification profiles. Various fragments of azu gene were fused at the 3'-end of the *gst* gene in frame. (b) GST-azu fusion proteins were purified after cellular growth and lysis, loaded on SDS-PAGE and visualized
5 by Coomassie Blue staining.

Figure 3 (a), (b) and (c). (a) Diagram showing construction of a GST-GFP-azu 50-77 fusion protein. The *gfp* gene was introduced at the 3'-end of the *gst* gene (for GST-GFP) and the *azu* 50-77 fragment was then ligated at the 3'-end of the *gfp* gene in frame to produce the GST-GFP-azu 50-77 fusion protein. GST-
10 GFP-azu 50-77 was purified as a single fusion protein from the cell lysates. Purified proteins were run on SDS-PAGE and detected by Coomassie Blue staining (9(b)) and also by Western blotting using anti-azurin antibody (9(c)).

Figure 4 (a), (b) and (c). Diagrams showing a kinetic study for the internalization of GST-Green Fluorescent Protein (GFP) and GST-GFP-azurin
15 fusion proteins. Green fluorescence was assayed in J774 cells treated with various concentrations of GST-GFP (10(a)) or GST-GFP-azu 50-77 (10(b)) at 37°C for 1 hr. Ten thousand cells were analyzed by flow cytometry. (c) Time-dependence of internalization of GST-GFP-azu 50-77. J774 cells were incubated with 200 µg/ml GST-GFP-azu 50-77 for indicated times at 37°C and analyzed by flow cytometry.

Figure 5 (a), (b) and (c). (a) Diagram showing the exotoxin A domain III (amino acids 405-613), as well as part of domain Ib (amino acids 381-404), fused to GST (GST-PEDIII) as earlier described for the GST-GFP fusion. The *azu* 50-77 fragment was then ligated to the carboxyl end of GST-PEDIII (GST-PEDIII-
20 *azu* 50-77), using PCR. (b) The fusion proteins were purified by glutathione Sepharose 4B column gel filtration column chromatography and run on SDS-PAGE for size determination. (c) Diagram showing action of GST-PEDIII-azu 50-77 fusion protein in UISO-Mel-2 cancer cells and in normal fibroblast (FBT) cells, as determined by PEDIII-mediated cytotoxicity. Various concentrations, as
25 indicated, of GST-PEDIII and GST-PEDIII-azu 50-77 were incubated with UISO-Mel-2 and FBT cells for 24 h, after which the cell viability was determined by
30 MTT assay.

Figure 6. Diagram showing the localization of the α -helix in wt-azurin as well as in the wt-azurin 50-77 protein transduction domain. Replacement of three amino acids in the azurin 50-77 domain by proline residues is indicated.

Figure 7. Diagram PEDIII-mediated cytotoxicity of GST-PEDIII-rusticyanin fusion protein against UISO-Mel-2 cancer cells and FBT cells. Various concentrations, as indicated, of GST-PEDIII and GST-PEDIII-azu 50-77 were incubated with UISO-Mel-2 and FBT cells for 24 h, after which the cell viability was determined by MTT assay.

Figure 8 (a) and (b). (a) Diagram showing the structural alignment of azurin with other cupredoxins, as computed by the VAST algorithm. The N-terminal extended parts of auracyanin B and rusticyanin, being absent in azurin, have been omitted in the figure. The gray bars indicate the regions of azurin that can be superimposed on residues from each neighbor. The blank spaces are unaligned regions. The azurin protein transduction domain (PTD), azurin amino acids 50-77, where there is no alignment with rusticyanin is highlighted by vertical dashed lines. The numbers in parentheses after the names of the cupredoxins are the protein database accession numbers. (b). Multiple amino acid sequence alignment of the residues comprising the middle part in some known bacterial azurins. Bacterial genus and species are abbreviated as follows: Psac, *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO:44); Pssy, *Pseudomonas syringae* (SEQ ID NO: 45); Neme, *Neisseria meningitidis* (SEQ ID NO:40); Vipa, *Vibrio parahaemolyticus* (SEQ ID NO:46); Bobr, *Bordetella bronchiseptica* (SEQ ID NO:47). Numbers of intervening amino acids are given in parenthesis. The CLUSTAL X software (Higgins and Sharp, Gene 101:6427-6432 (1988)) was used to generate this multiple sequence alignment.

Figure 9. Figure 9 depicts a diagram of the Laz protein from *Neisseria meningitidis* and the azurin protein from *Pseudomonas aeruginosa*. The wording to the left of the bar indicates the name of the protein. The wording above the bars indicate the name of the region of the protein directly below in the bar. The numbers below the bar indicate the amino acid number of the junction of the regions of the protein.

Figure 10. Figure 10 depicts the constructs of several azurin fusion proteins. The wording to left of the bar indicates the name of the construct, with plasmid and protein product indicated. The wording above the bar indicates the region of the protein depicted directly below in the bar. "N.Sp" indicates the
 5 Neisseria gonorrhoeae signal peptide; "H.8" indicates the H.8 region of Neisseria gonorrhoeae; "N.Azu" indicates Neisseria gonorrhoeae azurin; "P.Sp" indicates the Pseudomonas aeruginosa signal peptide; and "P.Azu" indicates the P. aeruginosa signal peptide.

10 DETAILED DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS

The present invention relates to methods and materials for delivering a cargo compound into a cell. Delivery of the cargo compound according to this invention is accomplished by the use of a suitable transport polypeptide. In one
 15 embodiment of the invention, the cargo compound is linked to the transport polypeptide. Suitable transport peptides include a cupredoxin, or a fragment of a cupredoxin containing a "cupredoxin entry domain". The term "cupredoxin entry domain" refers to a fragment of a cupredoxin that includes the amino sequence that is required for the entry of cupredoxin into a mammalian cancer cell. Cargo compounds delivered by the present invention include, but are not limited to,
 20 proteins, lipoproteins, polypeptides, peptides, polysaccharides, nucleic acids, including anti-sense nucleic acids, dyes, fluorescent and radioactive tags, microparticles or nanoparticles, toxins, inorganic and organic molecules, small molecules, and drugs. In some embodiments, the drugs and toxins kill tumor cells.

In one embodiment of the invention, the cupredoxin is an azurin, such as
 25 wt-azurin from Pseudomonas aeruginosa. "Wt-azurin" refers to wild-type azurin from P. aeruginosa. Similarly, the term "wt-azurin entry domain" refers to a fragment of wt-azurin that includes the amino sequence that is required for the entry of wt-azurin into a cell. In other embodiments of the invention, the cupredoxin is a plastocyanin, a rusticyanin, or a pseudoazurin, among others. In
 30 specific embodiments, the azurin is from Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas

syringa, *Neisseria meningitides*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio parahaemolyticus* or *Bordetella bronchiseptica*, among others.

In one embodiment, a cargo compound is delivered to kill or retard cell cycle progression in a cell, such as a cancer cell. Such a cancer cell can be, for example, an osteosarcoma cell, lung carcinoma cell, colon carcinoma cell, lymphoma cell, leukemia cell, soft tissue sarcoma cell or breast, liver, bladder or prostate carcinoma cell, among others. For example, the cargo compound can be a cell cycle control protein, such as p53; a cyclin-dependent kinase inhibitor, such as p16, p21 or p27; a suicide protein such as thymidine kinase or nitroreductase; a cytokine or other immunomodulatory protein such as interleukin 1, interleukin 2 or granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); or a toxin, such as *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, among others. In other embodiments, a biologically active fragment of one of the above classes of compounds is delivered. In another embodiment, the cargo compound is delivered in order to generate an image of the target tissue. For example, the target tissue can be a cancer and the cargo compound can be one commonly used to generate an image for detection by X-ray computed tomography (CT), Magnetic Resonance Imaging (MRI) and ultrasound. In these embodiments, the cargo compound is a gamma ray or positron emitting radioisotope, a magnetic resonance imaging contrast agent, an X-ray contrast agent, or an ultrasound contrast agent.

Cupredoxins

"Cupredoxins" are small blue copper containing proteins having electron transfer properties (10-20 kDa) that participate in, for example, bacterial redox chains or photosynthesis. The copper ion is solely bound by the protein matrix. A special distorted trigonal planar arrangement to two histidine and one cysteinate ligands around the copper gives rise to very peculiar electronic properties of the metal site and an intense blue color. A number of cupredoxins have been crystallographically characterized at medium to high resolution. The cupredoxins include the azurins, plastocyanins, rusticyanins, pseudoazurins, auracyanins and

azurin-like proteins. As used herein, the term “cupredoxin” includes the protein form without the copper atom present, as well as the copper containing protein.

Azurins

The azurins are copper containing proteins of 128 amino acid residues which belong to the family of cupredoxins involved in electron transfer in plants and certain bacteria. The azurins include those from *P. aeruginosa* (SEQ ID NO: 1) (“wt-azurin”), *A. xylosoxidans*, and *A. denitrificans*. Murphy, L. M. *et al.*, J. Mol. Biol. 315:859-71 (2002). Although the sequence homology between the azurins varies between 60-90%, the structural homology between these molecules is high. All azurins have a characteristic β -sandwich with Greek key motif and the single copper atom is always placed at the same region of the protein. In addition, azurins possess an essentially neutral hydrophobic patch surrounding the copper site (Murphy *et al.*).

Plastocyanins

The plastocyanins are cupredoxins that are found in eukaryotic plants and cyanobacteria. They contain one molecule of copper per molecule and are blue in their oxidized form. They occur in the chloroplast, where they function as electron carriers. Since the determination of the structure of poplar plastocyanin in 1978, the structure of algal (*Scenedesmus*, *Enteromorpha*, *Chlamydomonas*) and plant (French bean) plastocyanins has been determined either by crystallographic or NMR methods, and the poplar structure has been refined to 1.33 Å resolution. SEQ ID NO: 2 shows the amino acid sequence of plastocyanin from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*.

Despite the sequence divergence among plastocyanins of algae and vascular plants (e.g., 62% sequence identity between the *Chlamydomonas* and poplar proteins), the three-dimensional structures are conserved (e.g., 0.76 Å rms deviation in the C alpha positions between the *Chlamydomonas* and *Poplar* proteins). Structural features include a distorted tetrahedral copper binding site at one end of an eight-stranded antiparallel beta-barrel, a pronounced negative patch, and a flat hydrophobic surface. The copper site is optimized for its electron transfer function, and the negative and hydrophobic patches are proposed to be

involved in recognition of physiological reaction partners. Chemical modification, cross-linking, and site-directed mutagenesis experiments have confirmed the importance of the negative and hydrophobic patches in binding interactions with cytochrome *f*, and validated the model of two functionally significant electron transfer paths in plastocyanin. One putative electron transfer path is relatively short (approximately 4 Å) and involves the solvent-exposed copper ligand His-87 in the hydrophobic patch, while the other is more lengthy (approximately 12-15 Å) and involves the nearly conserved residue Tyr-83 in the negative patch. Redinbo *et al.*, J. Bioenerg. Biomembr. 26(1):49-66 (1994).

10 Rusticyanins

Rusticyanins are blue-copper containing single-chain polypeptides obtained from a thiobacillus. The X-ray crystal structure of the oxidized form of the extremely stable and highly oxidizing cupredoxin rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* (SEQ ID NO: 3) has been determined by multiwavelength anomalous diffraction and refined to 1.9 Å resolution. The rusticyanins are composed of a core beta-sandwich fold composed of a six- and a seven-stranded β-sheet. Like other cupredoxins, the copper ion is coordinated by a cluster of four conserved residues (His 85, Cys138, His143, Met148) arranged in a distorted tetrahedron. Walter, R.L. *et al.*, J. Mol. Biol. 263:730-51 (1996).

20 Auracyanins

Three small blue copper proteins designated auracyanin A, auracyanin B 1, and auracyanin B-2 have been isolated from the thermophilic green gliding photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. The two B forms have almost identical properties to each other, but are distinct from the A form. The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis demonstrates apparent monomer molecular masses as 14 (A), 18 (B-2), and 22 (B-1) kDa.

The amino acid sequence of auracyanin A has been determined and showed auracyanin A to be a polypeptide of 139 residues. (Van Dreissche *et al.*, Protein Science 8:947-957 (1999). His58, Cys123, His128, and Met132 are spaced in a way to be expected if they are the evolutionary conserved metal ligands as in the known small copper proteins plastocyanin and azurin. Secondary structure

20

prediction also indicates that auracyanin has a general beta-barrel structure similar to that of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* and plastocyanin from poplar leaves. However, auracyanin appears to have sequence characteristics of both small copper protein sequence classes. The overall similarity with a consensus
5 sequence of azurin is roughly the same as that with a consensus sequence of plastocyanin, namely 30.5%. The N-terminal sequence region 1-18 of auracyanin is remarkably rich in glycine and hydroxy amino acids. Id. See exemplary amino acid sequence SEQ ID NO: 33 for chain A of auracyanin from *Chloroflexus aurantiacus* (NCBI Protein Data Bank Accession No. AAM12874).

10 The auracyanin B molecule has a standard cupredoxin fold. The crystal structure of auracyanin B from *Chloroflexus aurantiacus* has been studied. (Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 306:47-67 (2001).) With the exception of an additional N-terminal strand, the molecule is very similar to that of the bacterial cupredoxin, azurin. As in other cupredoxins, one of the Cu ligands lies on strand 4 of the
15 polypeptide, and the other three lie along a large loop between strands 7 and 8. The Cu site geometry is discussed with reference to the amino acid spacing between the latter three ligands. The crystallographically characterized Cu-binding domain of auracyanin B is probably tethered to the periplasmic side of the cytoplasmic membrane by an N-terminal tail that exhibits significant sequence
20 identity with known tethers in several other membrane-associated electron-transfer proteins. The amino acid sequences of the B forms are presented in McManus *et al.* (J Biol Chem. 267:6531-6540 (1992).). See exemplary amino acid sequence SEQ ID NO: 34 for chain A of auracyanin B from *Chloroflexus aurantiacus* (NCBI Protein Data Bank Accession No. 1QHQA).

25

Pseudoazurins

The pseudoazurins are a family of blue-copper containing single-chain polypeptides. The amino acid sequence of pseudoazurin obtained from *Achromobacter cycloclastes* is shown in SEQ ID NO: 4. The X-ray structure
30 analysis of pseudoazurin shows that it has a similar structure to the azurins although there is low sequence homology between these proteins. Two main

21

differences exist between the overall structure of the pseudoazurins and azurins. There is a carboxy terminus extension in the pseudoazurins, relative to the azurins, consisting of two alpha-helices. In the mid-peptide region azurins contain an extended loop, shortened in the pseudoazurins, which forms a flap containing a short α -helix. The only major differences at the copper atom site are the conformation of the MET side-chain and the Met-S copper bond length, which is significantly shorter in pseudoazurin than in azurin.

Cytotoxic Activity of Cupredoxins

Cupredoxins have been studied extensively for their electron transfer (redox) properties but until recently were not known to exhibit cytotoxic effects. The present invention is predicated by the inventors' surprising discovery that cupredoxins as well as the iron (haem) containing redox protein cytochrome c551 induce either apoptosis or inhibit cell cycle progression in J774 mouse macrophage tumor cells and in human cancer cells. The redox activity of cupredoxins is not critical for their cytotoxic activity. For example, cupredoxins without a copper atom often exhibit a much lower redox activity compared to those containing the copper atom, but nevertheless demonstrate significant cytotoxic activity. In comparison to their activity in cancer cells, cupredoxins induce only a low level of apoptosis *in vivo* in normal tissues of tumor-bearing cupredoxin-treated mice.

The cytotoxic activity of cupredoxins is described in co-pending U.S. patent application serial number 10/047,710, filed January 15, 2002, and in co-pending U.S. patent application serial number 10/720,603, filed November 24, 2003. These prior applications are hereby incorporated by reference.

The present inventors now show that the selective effect of cupredoxins on cancer cells is related to the ability of cupredoxins to enter these cells. In Example 5, the inventors show that cupredoxins enter J774 cells. These cells are ascites forms of murine reticulum cell sarcoma with macrophage-like properties. In Examples 18 and 19, the inventors have shown that an azurin-like protein, the H.8 outer membrane from *Neisseria*, also known as Laz, can specifically enter brain

tumor cells. In comparison, cupredoxins show an extremely reduced rate of entry into normal cells.

In one embodiment, the present invention relates to a "complex" containing a cupredoxin, or a fragment of a cupredoxin, linked to a "cargo compound" that is to be delivered into a cell. The cargo compound may be linked either covalently or non-covalently to form the complex. Methods of preparing such a complex are well known to those skilled in the art. For example, if the cargo compound is a protein or polypeptide, the complex can be formed as a fusion protein. Alternatively, the cargo compound may be covalently linked to the cupredoxin, or cupredoxin fragment, either directly or through a linker molecule, via, for example a disulfide or ester linkage.

Cupredoxin Entry Domain

The invention provides for a protein transduction domain that allows for the transport of linked cargo into mammalian cancer cells but not non-cancerous cells. It has been discovered that cupredoxin proteins comprise a protein transduction domain, the cupredoxin entry domain, which facilitates the entry of linked cargo into mammalian cancer cells. In some embodiments, the entire cupredoxin protein can be used to facilitate the transport linked cargo selectively into cancer cells. In other embodiments, a portion of a cupredoxin can be used to transport linked cargo into cancer cells. In some embodiments, the cupredoxin entry domain consists of a region of a cupredoxin that is less than the full length wild-type protein. In some embodiments, the cupredoxin entry domain consists more than about 10 residues, about 15 residues or about 20 residues of a cupredoxin. In some embodiments, the cupredoxin entry domain consists of not more than about 50 residues, about 40 residues or about 30 residues of a cupredoxin. In some embodiments, the cupredoxin entry domain has at least about 90% amino acid sequence identity, at least about 95% amino acid sequence identity or at least about 99% amino acid sequence identity to a cupredoxin.

As used herein, the terms "polypeptide," "peptide," and "protein" are used interchangeably to refer to a polymer of amino acid residues. A "polypeptide",

"peptide" or "protein" may be synthesized within a cell and isolated from other proteins and cellular components. Alternatively, a "polypeptide", "peptide" or "protein" may be artificially synthesized according to methods well known to those in the art, and thus also be free of other proteins. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical analogue of a corresponding naturally occurring amino acid. The terms also apply to naturally occurring amino acid polymers. The terms "polypeptide," "peptide," and "protein" are also inclusive of modifications including, but not limited to, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation and ADP-ribosylation. It will be appreciated that polypeptides are not always entirely linear. For instance, polypeptides may be branched as a result of ubiquitination and they may be circular (with or without branching), generally as a result of post-translation events, including natural processing event and events brought about by human manipulation which do not occur naturally. Circular, branched and branched circular polypeptides may be synthesized by non-translation natural process and by entirely synthetic methods as well.

The Examples describe a method of identifying fragments of *P. aeruginosa* wt-azurin that are suitable for use in the present invention. Such a method can also be used to identify fragments of other cupredoxins. Examples 1 and 2 describe the construction of a series of glutathione S-transferase ("GST") fusions of wt-azurin truncated at both the N- and the C-terminal. These examples also describe the purification of the fusion protein products.

Example 9 shows the internalization of such fusions in J774 cells at 37°C. While wt-azurin was internalized, GST remained at the periphery of the cells and was not internalized. azu 36-128 (SEQ ID NO: 5) and azu 36-89 (SEQ ID NO: 6) were internalized, as was azu 36-77 (SEQ ID NO: 7). Further truncations show that, while azu 50-77 (SEQ ID NO: 9) is internalized, the internalization of azu 36-50 (SEQ ID NO: 8) is highly inefficient. Further truncations of azu 50-77 (SEQ ID NO: 9) to azu 50-66 (SEQ ID NO: 10) and azu 67-77 (SEQ ID NO: 11) demonstrate very little internalization, indicating that efficient internalization

requires not interfering with the sequence at or about positions 66-67. From a practical standpoint, the data support the use of amino acids 50 to 77 for efficient transport.

In some embodiments, the cupredoxin entry domain is a wt-azurin entry domain. In one embodiment of the present invention, a wt-azurin entry domain contains at least amino acids 50 to 77 of wt-azurin (SEQ ID NO: 9). In another embodiment of the invention, the wt-azurin entry domain contains at least amino acids 36 to 77 of wt-azurin (SEQ ID NO: 7). In another embodiment of the invention, the wt-azurin entry domain contains at least amino acids 36 to 89 of wt-azurin (SEQ ID NO: 6). In another embodiment of the invention, the wt-azurin entry domain contains at least amino acids 36 to 128 of wt-azurin (SEQ ID NO: 5). In yet another embodiment of the invention, the wt-azurin entry domain contains at least amino acids 50 to 67 of wt-azurin (SEQ ID NO: 37). In another embodiment of the invention, the wt-azurin entry domain contains at least amino acids 53 to 70 of wt-azurin (SEQ ID NO: 41). In yet another embodiment of the invention, the wt-azurin entry domain contains at least amino acids 53 to 64 of wt-azurin (SEQ ID NO: 42).

In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain is an entry domain from a cupredoxin other than *P. aeruginosa* azurin. In different embodiments, the cupredoxin entry domain may be a fragment of plastocyanin from the cyanobacterium *Phormidium laminosum* (SEQ ID NO: 2), rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* (SEQ ID NO: 3); pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* (SEQ ID NO: 4), azurin from *Pseudomonas syringae* (SEQ ID NO: 29), azurin from *Neisseria meningitidis* (SEQ ID NO: 30), azurin from *Neisseria gonorrhoeae* (SEQ ID NO: 36), azurin from *Vibrio parahaemolyticus* (SEQ ID NO: 31), azurin from *Bordetella bronchiseptica* (SEQ ID NO: 32), azurin from *Bordetella pertussis* (SEQ ID NO: 43) or an auracyanin from *Chloroflexus aurantiacus* (SEQ ID NO: 33 and 34).

In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain contains at least amino acids 57 to 89 of auracyanin B of *Chloroflexus aurantiacus* (SEQ ID NO: 38). In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry

domain contains at least amino acids 50 to 77 of *Bordetella pertussis* (SEQ ID NO: 39). In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain contains at least amino acids 106 to 132 of *N. meningitidis* (SEQ ID NO: 40). In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain contains at least amino acids 51-77 of *Pseudomonas syringae* azurin (SEQ ID NO: 45). In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain contains at least amino acids 89-115 of *Neisseria meningitidis* Laz (SEQ ID NO: 40). In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain contains at least amino acids 52-78 of *Vibrio parahaemolyticus* azurin (SEQ ID NO: 46). In another embodiment of the invention, the cupredoxin entry domain contains at least amino acids 51-77 of *Bordetella bronchiseptica* azurin (SEQ ID NO: 47).

Modification of a Cupredoxin Entry Domain

In another embodiment of the present invention, a cupredoxin entry domain is chemically modified or genetically altered to produce variants that retain the ability to transport a cargo compound into a cell. For example, Example 14 shows that wt-azurin having proline residues introduced at positions 54, 61 and 70 retains its ability to enter UIISO-Mel-2 cells.

In another embodiment, the cupredoxin entry domain comprises a conserved amino acid sequence DGXXXXDXXYXKXXD (SEQ ID NO: 35) or DGXXXXDXXYXKXXD (SEQ ID NO: 48) where D is aspartic acid, G is glycine, Y is tyrosine, K is lysine and X is any amino acid. See Example 17.

Variants of a cupredoxin entry domain may be synthesized by standard techniques. Derivatives are amino acid sequences formed from native compounds either directly or by modification or partial substitution. Analogs are amino acid sequences that have a structure similar, but not identical, to the native compound but differ from it in respect to certain components or side chains. Analogs may be synthesized or from a different evolutionary origin.

Variants may be full length or other than full length, if the derivative or analog contains a modified amino acid. Variants of a cupredoxin entry domain include, but are not limited to, molecules comprising regions that are substantially

homologous to the cupredoxin entry domain by at least about 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity over an amino acid sequence of identical size or when compared to an aligned sequence in which the alignment is performed by a homology algorithm.

5 The term "percent (%) amino acid sequence identity" between a cupredoxin entry domain and a candidate sequence is defined as the percentage of amino acid residues in a cupredoxin entry domain that are identical with amino acid residues in a candidate sequence when the two sequences are aligned. To determine % amino acid identity, sequences are aligned and if necessary, gaps are introduced to
10 achieve the maximum % sequence identity; conservative substitutions are not considered as part of the sequence identity. Amino acid sequence alignment procedures to determine percent identity are well known to those of skill in the art. Often publicly available computer software such as BLAST, BLAST2, ALIGN2 or Megalign (DNASTAR) software is used to align peptide sequences.

15 When amino acid sequences are aligned, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) can be calculated as:

20 % amino acid sequence identity = $X/Y \cdot 100$
 where

 X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program's or algorithm's alignment of A and B
 and

25 Y is the total number of amino acid residues in B.

 If the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

30 Changes can be introduced into a cupredoxin entry domain that incur alterations in the amino acid sequences of the cupredoxin entry domain that do nullify the ability of the cupredoxin entry domain to transport a cargo compound

into a cell. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the sequence of the cupredoxin entry domain without nullifying its ability to transport a cargo compound into a cell, whereas an "essential" amino acid residue is required for such activity.

5 Amino acids for which "conservative" substitutions can be made are well known in the art. Useful conservative substitutions are shown in Table 1, "Preferred substitutions." Conservative substitutions whereby an amino acid of one class is replaced with another amino acid of the same class fall within the scope of the invention so long as the substitution does not nullify the activity of
10 the cupredoxin entry domain. Such exchanges that result in altered cupredoxin entry domain activity are contemplated as part of the invention so long as such activity is appreciable.

Table 1 Preferred substitutions

Original residue	Exemplary substitutions	Preferred substitutions
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucine	Leu

“Non-conservative” substitutions that affect (1) the structure of the polypeptide backbone, such as a β -sheet or α -helical conformation, (2) the charge, (3) hydrophobicity, or (4) the bulk of the side chain of the target site can modify the cupredoxin entry domain function. Residues are divided into groups based on common side-chain properties as denoted in Table 2. Non-conservative substitutions entail exchanging a member of one of these classes for another class.

Non-conservative substitutions whereby an amino acid of one class is replaced with another amino acid of a different class fall within the scope of the invention so long as the substitution does not nullify the activity of the cupredoxin entry domain. Such exchanges that result in altered cupredoxin domain activity are contemplated as part of the invention so long as such activity is appreciable.

Table 2 Amino acid classes

Class	Amino acids
hydrophobic	Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile
neutral hydrophilic	Cys, Ser, Thr
acidic	Asp, Glu
basic	Asn, Gln, His, Lys, Arg
disrupt chain conformation	Gly, Pro
aromatic	Trp, Tyr, Phe

In another embodiment, the variants of a cupredoxin entry domain have a significant structural similarity to *P. aeruginosa* azurin residues 50-77. Examples of studies that determine significant structural homology between cupredoxins and other proteins include Toth *et al.* (Developmental Cell 1:82-92 (2001)). Specifically, significant structural homology between a variant of the cupredoxin entry domain and *P. aeruginosa* azurin residues 50-77 is determined by using the VAST algorithm (Gibrat *et al.*, Curr Opin Struct Biol 6:377-385 (1996); Madej *et*

al., Proteins 23:356-3690 (1995)). In specific embodiments, the VAST p value from a structural comparison of a variant of the cupredoxin entry domain and *P. aeruginosa* azurin residues 50-77 is less than about 10^{-3} , less than about 10^{-5} , or less than about 10^{-7} . In other embodiments, significant structural homology
 5 between a variant of the cupredoxin entry domain and *P. aeruginosa* azurin residues 50-77 can be determined by using the DALI algorithm (Holm & Sander, *J. Mol. Biol.* 233:123-138 (1993)). In specific embodiments, the DALI Z score for a pairwise structural comparison is at least about 3.5, at least about 7.0, or at least about 10.0.

10 Modifications to the cupredoxin entry domain can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis (Carter, *Biochem J.* 237:1-7 (1986); Zoller and Smith, *Methods Enzymol.* 154:329-50 (1987)), cassette mutagenesis, restriction selection mutagenesis (Wells *et al.*, *Gene*
 15 34:315-23 (1985)) or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce a cupredoxin entry domain variant nucleic acid. In addition, nucleotides encoding entry domains with structural similarity to that of the cupredoxin entry domains may be synthesized by methods that are well known in the art. Further, protein molecules that are wild type or variant cupredoxin entry
 20 domains may be synthesized by methods that are well known in the art.

Nucleic Acids Coding for a the Cupredoxin Entry Domain and Complex of a Cupredoxin Entry Domain Linked to a Cargo Compound

In another aspect, the present invention provides a nucleic acid molecule
 25 encoding a fusion protein comprising a cupredoxin entry domain linked to a cargo compound, where the cargo compound is a protein or peptide. The nucleic acid molecule according to the invention can be prepared by a combination of known techniques in the art. For instance, nucleic acid sequences for the cupredoxin entry domain and the cargo compound can individually be prepared by chemical
 30 synthesis or cloning. The nucleic acid sequences are then ligated in order with a ligase to give a nucleic acid molecule of interest.

Methods of Delivering a Cargo Compound using a Cupredoxin Entry Domain

[0100] Many arginine-rich peptides are known to translocate through mammalian cell membranes and carry protein cargo compounds inside such cells. Suzuki, T., *et al.* J. Biol. Chem. 277:2437-43 (2002). For example, a short arginine-rich 11 amino acid (amino acids 47-57) segment of HIV Tat protein allows transport of cargo proteins into mammalian cells. Schwarze, SR., *et al.* Trends Cell Biol. 10:290-95 (2000). Synthetic entry domains that strengthen the alpha-helical content and optimize the placement of arginine residues have been shown to have enhanced potential as protein transduction domains. Ho, A., *et al.* Cancer Res. 61:474-77 (2001). In comparison, wt-azurin has a single arginine residue. It is therefore believed, but not relied upon for the present invention, that its mode of entry is different from that of the Tat protein.

The present invention encompasses the use of those cupredoxin fragments that facilitate the entry of a cargo compound into a cell. Such fragments may be determined by any method that identifies those fragments required for entry into a cell. In one such method, a cupredoxin fragment is linked to a marker substance and a test performed to determine whether the cupredoxin fragment enters a cell. Such methods may be used to identify suitable fragments of the cupredoxins discussed above.

In various embodiments of the present invention, the cargo compound is attached to a cupredoxin, such as azurin from *P. aeruginosa* (SEQ ID NO: 1) ("wt-azurin"); plastocyanin from the cyanobacterium *Phormidium laminosum* (SEQ ID NO: 2); rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* (SEQ ID NO: 3); or pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* (SEQ ID NO: 4), azurins from *Pseudomonas syringa* (SEQ ID NO: 29), *Neisseria meningitidis* (SEQ ID NO: 30), *Vibrio parahaemolyticus* (SEQ ID NO: 31), *Bordetella bronchiseptica* (SEQ ID NO: 32), auracyanin A and B from *Chloroflexus aurantiacus* (SEQ ID NO. 33 and 34) or *Neisseria gonorrhoeae* (SEQ ID NO. 36), among other azurin and azurin-like proteins. In other embodiments, the cargo is linked to a cupredoxin entry domain.

In various embodiments of the present invention, a cupredoxin entry domain delivers a cargo compound into a cell *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*. For example, delivery may be achieved *in vitro* by adding a complex of a cupredoxin entry domain and a cargo compound to a cell culture, such as a pap smear.

5 Alternatively, delivery may be achieved *ex vivo* by adding the complex to a sample removed from a patient, for example, blood, tissue, or bone marrow, and returning the treated sample to the patient. Delivery may also be achieved by administration of the complex directly to a patient. The methods of the present invention may be used for therapeutic, prophylactic, diagnostic or research
10 purposes. Cargo compounds delivered by the present invention include, but are not limited to, proteins, lipoproteins, polypeptides, peptides, polysaccharides, nucleic acids, including anti-sense nucleic acids, dyes, microparticles or nanoparticles, toxins, organic and inorganic molecules, small molecules, and drugs.

15 In one embodiment, a detectable substance, for example, a fluorescent substance, such as green fluorescent protein; a luminescent substance; an enzyme, such as β -galactosidase; or a radiolabelled or biotinylated protein is delivered to confer a detectable phenotype to a cell. Similarly, microparticles or nanoparticles labeled with a detectable substance, for example, a fluorescent substance, can be
20 delivered. One example of suitable nanoparticles is found in U.S. Pat. No. 6,383,500, issued May 7, 2002, which is hereby expressly incorporated by reference. Many such detectable substances are known to those skilled in the art.

In some embodiments, the cargo compound is a detectable substance that is suitable for X-ray computed tomography, magnetic resonance imaging, ultrasound
25 imaging or radionuclide scintigraphy. In these embodiments, the cargo compound is administered to the patient for purposes of diagnosis. A contrast agent is administered as a cargo compound to enhance the image obtained by X-ray CT, MRI and ultrasound. The administration of a radionuclide cargo compound that is targeted to tumor tissue via the cupredoxin entry domain can be used for
30 radionuclide scintigraphy. In some embodiments, the cupredoxin entry domain may contain the radionucleotide with or without a cargo compound. In other

embodiments, the cargo compound is a gamma ray or positron emitting radioisotope, a magnetic resonance imaging contrast agent, an X-ray contrast agent, or an ultrasound contrast agent.

5 Ultrasound contrast agents suitable for use as cargo compounds include, but are not limited to, a microbubble of a biocompatible gas, a liquid carrier, and a surfactant microsphere, further comprising an optional linking moiety, L_n , between the targeting moieties and the microbubble. In this context, the term liquid carrier means aqueous solution and the term surfactant means any amphiphilic material which produces a reduction in interfacial tension in a solution. A list of suitable
10 surfactants for forming surfactant microspheres is disclosed in EP0727225A2, herein expressly incorporated by reference. The term surfactant microsphere includes nanospheres, liposomes, vesicles and the like. The biocompatible gas can be air, or a fluorocarbon, such as a C_3 - C_5 perfluoroalkane, which provides the difference in echogenicity and thus the contrast in ultrasound imaging. The gas is
15 encapsulated or contained in the microsphere to which is attached the cupredoxin entry domain, optionally via a linking group. The attachment can be covalent, ionic or by van der Waals forces. Specific examples of such contrast agents include lipid encapsulated perfluorocarbons with a plurality of tumor neovasculature receptor binding peptides, polypeptides or peptidomimetics.

20 X-ray contrast agents suitable for use as cargo compounds include, but are not limited to, one or more X-ray absorbing or "heavy" atoms of atomic number 20 or greater, further comprising an optional linking moiety, L_n , between the cupredoxin entry domain and the X-ray absorbing atoms. The frequently used heavy atom in X-ray contrast agents is iodine. Recently, X-ray contrast agents
25 comprised of metal chelates (e.g., U.S. Pat. No. 5,417,959) and polychelates comprised of a plurality of metal ions (e.g., U.S. Pat. No. 5,679,810) have been disclosed. More recently, multinuclear cluster complexes have been disclosed as X-ray contrast agents (e.g., U.S. Pat. No. 5,804,161, PCT WO91/14460, and PCT WO 92/17215).

30 MRI contrast agents suitable for use as cargo compounds include, but are not limited to, one or more paramagnetic metal ions, further comprising an

optional linking moiety, L_n , between the cupredoxin entry domain and the paramagnetic metal ions. The paramagnetic metal ions are present in the form of metal complexes or metal oxide particles. U.S. Pat. Nos. 5,412,148, and 5,760,191, describe examples of chelators for paramagnetic metal ions for use in MRI contrast agents. U.S. Pat. No. 5,801,228, U.S. Pat. No. 5,567,411, and U.S. Pat. No. 5,281,704, describe examples of polychelants useful for complexing more than one paramagnetic metal ion for use in MRI contrast agents. U.S. Pat. No. 5,520,904, describes particulate compositions comprised of paramagnetic metal ions for use as MRI contrast agents.

10 In another embodiment, a cargo compound is delivered to kill or retard cell cycle progression in a cell, such as a cancer cell. Such a cancer cell can be, for example, an osteosarcoma cell, lung carcinoma cell, colon carcinoma cell, lymphoma cell, leukemia cell, soft tissue sarcoma cell or breast, liver, bladder or prostate carcinoma cell. For example, the cargo compound can be a cell cycle control protein, such as p53; a cyclin-dependent kinase inhibitor, such as p16, p21 or p27; a suicide protein such as thymidine kinase or nitroreductase; a cytokine or other immunomodulatory protein such as interleukin 1, interleukin 2 or granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); or a toxin, such as *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. In other embodiments, a biologically active fragment of one of the above classes of compounds is delivered.

In yet another embodiment, the cargo compound is a nucleic acid coding for one of the above classes of compounds. In yet another embodiment, the cargo compound is a drug used to treat cancer. Such drugs include, for example, 5-fluorouracil; Interferon α ; Methotrexate; Tamoxifen; and Vincristine. The above examples are provided for illustration only, many other such compounds are known to those skilled in the art.

Cargo compounds suitable for treating cancer include, but not limited to, alkylating agents such as nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosoureas, ethylenimines, and triazenes; antimetabolites such as folate antagonists, purine analogues, and pyrimidine analogues; antibiotics such as anthracyclines, bleomycins, mitomycin, dactinomycin, and plicamycin; enzymes such as L-

asparaginase; farnesyl-protein transferase inhibitors; 5.alpha.-reductase inhibitors; inhibitors of 17.beta.-hydroxysteroid dehydrogenase type 3; hormonal agents such as glucocorticoids, estrogens/antiestrogens, androgens/antiandrogens, progestins, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonists, octreotide acetate;

5 microtubule-disruptor agents, such as ecteinascidins or their analogs and derivatives; microtubule-stabilizing agents such as taxanes, for example, paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™), and their analogs, and epothilones, such as epothilones A-F and their analogs; plant-derived products, such as vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, taxanes; and topoisomerase inhibitors; prenyl-protein

10 transferase inhibitors; and miscellaneous agents such as hydroxyurea, procarbazine, mitotane, hexamethylmelamine, platinum coordination complexes such as cisplatin and carboplatin; and other agents used as anti-cancer and cytotoxic agents such as biological response modifiers, growth factors; immune modulators and monoclonal antibodies.

15 Representative examples of these classes of anti-cancer and cytotoxic agents include but are not limited to mechlorethamine hydrochloride, cyclophosphamide, chlorambucil, melphalan, ifosfamide, busulfan, carmustine, lomustine, semustine, streptozocin, thiotepa, dacarbazine, methotrexate, thioguanine, mercaptopurine, fludarabine, pentastatin, cladribin, cytarabine,

20 fluorouracil, doxorubicin hydrochloride, daunorubicin, idarubicin, bleomycin sulfate, mitomycin C, actinomycin D, safracins, saframycins, quinocarcins, discodermolides, vincristine, vinblastine, vinorelbine tartrate, etoposide, etoposide phosphate, teniposide, paclitaxel, tamoxifen, estramustine, estramustine phosphate sodium, flutamide, buserelin, leuprolide, pteridines, diyneses, levamisole, aflacon,

25 interferon, interleukins, aldesleukin, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoin, irinotecan hydrochloride, betamethosone, gemcitabine hydrochloride, altretamine, and topoteca and any analogs or derivatives thereof.

Preferred members of these classes include, but are not limited to, paclitaxel, cisplatin, carboplatin, doxorubicin, carminomycin, daunorubicin,

30 aminopterin, methotrexate, methopterin, mitomycin C, ecteinascidin 743, or pofiromycin, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurine, gemcitabine, cytosine arabinoside,

podophyllotoxin or podophyllotoxin derivatives such as etoposide, etoposide phosphate or teniposide, melphalan, vinblastine, vincristine, leurosine, vindesine and leurosine.

Examples of anticancer and other cytotoxic agents useful as cargo compounds include the following: epothilone derivatives as found in German Patent No. 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253 and WO 00/00485; cyclin dependent kinase inhibitors as found in WO 99/24416 (see also U.S. Pat. No. 6,040,321); and prenyl-protein transferase inhibitors as found in WO 97/30992 and WO 98/54966; and agents such as those described generically and specifically in U.S. Pat. No. 6,011,029 (the compounds of which U.S. patent can be employed together with any NHR modulators (including, but not limited to, those of present invention) such as AR modulators, ER modulators, with LHRH modulators, or with surgical castration, especially in the treatment of cancer).

The above other therapeutic agents, when employed as cargo compounds with the compounds of the present invention, may be used, for example, in those amounts indicated in the Physicians' Desk Reference (PDR) or as otherwise determined by one of ordinary skill in the art.

Pharmaceutical Compositions Containing a Cupredoxin Entry Domain

Pharmaceutical compositions containing a complex of a cupredoxin entry domain linked to a cargo compound can be manufactured in any conventional manner, e.g., by conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The complex can be readily combined with a pharmaceutically acceptable carrier well-known in the art. Such carriers enable the preparation to be formulated as a tablet, pill, dragee, capsule, liquid, gel, syrup, slurry, suspension, and the like. Suitable excipients can also include, for example, fillers and cellulose preparations. Other

excipients can include, for example, flavoring agents, coloring agents, detackifiers, thickeners, and other acceptable additives, adjuvants, or binders.

Such compositions can be used in, for example, the detection or imaging of a cell type or in the treatment of a condition related to cell death or in the prevention thereof. The compositions can be administered in an amount sufficient to prevent or treat a condition related to resistance to cell death. As used herein, the term "a condition related to resistance to cell death" refers to a disease, state, or ailment characterized by at least a tendency for prolonged cell life when compared with a healthy cell of like kind as determined by a reasonable, skilled physician or clinician. Typically, the host organism is a mammal, such as a human or animal.

Administration of Compositions Containing a Cupredoxin Entry Domain

Compositions containing a cupredoxin entry domain can be administered by any suitable route, for example, by oral, buccal, inhalation, sublingual, rectal, vaginal, transurethral, nasal, topical, percutaneous, i.e., transdermal or parenteral (including intravenous, intramuscular, subcutaneous and intracoronary administration). The compositions and pharmaceutical formulations thereof can be administered in any amount effective to achieve its intended purpose. When administered to treat a condition related to resistance to cell death, the composition is administered in a therapeutically effective amount. A "therapeutically effective amount" is an amount effective to prevent development of, or to alleviate the existing symptoms of, the subject being treated. Determination of a therapeutically effective amount is well within the capability of those skilled in the art.

In various embodiments, the composition includes carriers and excipients (including but not limited to buffers, carbohydrates, mannitol, proteins, polypeptides or amino acids such as glycine, antioxidants, bacteriostats, chelating agents, suspending agents, thickening agents and/or preservatives), water, oils, saline solutions, aqueous dextrose and glycerol solutions, other pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological

conditions, such as buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents and the like. It will be recognized that, while any suitable carrier known to those of ordinary skill in the art may be employed to administer the compositions of this invention, the type of carrier will vary depending on the mode of administration.

5 Compounds may also be encapsulated within liposomes using well-known technology. Biodegradable microspheres may also be employed as carriers for the compositions of this invention. Suitable biodegradable microspheres are shown, for example, in U.S. Patent Nos. 4,897,268, 5,075,109, 5,928,647, 5,811,128, 5,820,883, 5,853,763, 5,814,344 and 5,942,252. "Compounds" as used herein,
10 include the peptides, amino acid sequences, cargo compounds and complexes of the present invention

The half-life in the bloodstream of the compositions of the invention can be extended or optimized by several methods well known to those in the art, including but not limited to, circularized peptides (Monk *et al.*, BioDrugs
15 19(4):261-78, (2005); DeFreest *et al.*, J. Pept. Res. 63(5):409-19 (2004)), D,L-peptides (diastereomer), (Futaki *et al.*, J. Biol. Chem. Feb 23;276(8):5836-40 (2001); Papo *et al.*, Cancer Res. 64(16):5779-86 (2004); Miller *et al.*, Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987)); peptides containing unusual amino acids (Lee *et al.*, J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004)), and N- and C- terminal modifications
20 (Labrie *et al.*, Clin. Invest. Med. 13(5):275-8, (1990)). Of particular interest are d-isomerization (substitution) and modification of peptide stability via D-substitution or L- amino acid substitution.

The compositions of the invention may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques, or may be sterile filtered. The resulting aqueous
25 solutions may be packaged for use as is, or lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to administration.

The compositions of the invention may be administered in a variety of ways, including by injection (*e.g.*, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal and the like), by inhalation, by topical administration, by
30 suppository, by using a transdermal patch or by mouth.

When administration is by injection, composition may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. The solution may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the composition may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, *e.g.*, sterile pyrogen-free water, before use.

When administration is by inhalation, the composition may be delivered in the form of an aerosol spray from pressurized packs or a nebulizer with the use of a suitable propellant, *e.g.*, dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, *e.g.*, gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the proteins and a suitable powder base such as lactose or starch.

When administration is by topical administration, the composition may be formulated as solutions, gels, ointments, creams, suspensions, and the like, as are well known in the art. In some embodiments, administration is by means of a transdermal patch. When administration is by suppository (*e.g.*, rectal or vaginal), composition may also be formulated in compositions containing conventional suppository bases.

When administration is oral, the composition can be readily formulated in combination with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. A solid carrier, such as mannitol, lactose, magnesium stearate, and the like may be employed; such carriers enable the chemotaxin to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a subject to be treated. For oral solid formulations such as, for example, powders, capsules and tablets, suitable excipients include fillers such as sugars, cellulose preparation, granulating agents, and binding agents.

Other convenient carriers, as well-known in the art, also include multivalent carriers, such as bacterial capsular polysaccharide, a dextran or a genetically engineered vector. In addition, sustained-release formulations that

include the composition allow for the release of the composition over extended periods of time, such that without the sustained release formulation, composition would be cleared from a subject's system, and/or degraded by, for example, proteases and simple hydrolysis before eliciting or enhancing an therapeutic effect.

5 The exact formulation, route of administration, and dosage is determined by the attending physician in view of the patient's condition. Dosage amount and interval can be adjusted individually to provide plasma levels of the complex which are sufficient to maintain therapeutic effect. Generally, the desired composition is administered in an admixture with a pharmaceutical carrier selected
10 with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.

 The appropriate dosage will, of course, vary depending upon, for example, the compound containing the cupredoxin entry domain employed, the host, the mode of administration and the nature and severity of the conditions being treated
15 or diagnosed. However, in one embodiment of the methods of the present invention, satisfactory treatment results in humans are indicated to be obtained at daily dosages from about 0.001 to about 20 mg/kg of body weight of the compound containing the cupredoxin entry domain. In one embodiment, an indicated daily dosage for treatment in humans may be in the range from about 0.7
20 mg to about 1400 mg of a compound containing the cupredoxin entry domain conveniently administered, for example, in daily doses, weekly doses, monthly doses, and/or continuous dosing. Daily doses can be in discrete dosages from 1 to 12 times per day. Alternatively, doses can be administered every other day, every third day, every fourth day, every fifth day, every sixth day, every week, and
25 similarly in day increments up to 31 days. Dosing can be continuous, intermittent or a single dose, using any applicable dosing form, including tablet, patches, i.v. administration and the like. More specifically, the composition is administered in a therapeutically effective amount. In specific embodiments, the therapeutically effective amount is from about 0.01-20 mg/kg of body weight. In specific
30 embodiments, the dose level is about 10 mg/kg/day, about 15 mg/kg/day, about 20

mg/kg/day, about 25 mg/kg/day, about 30 mg/kg/day, about 35 mg/kg/day, about 40 mg/kg/day, about 45 mg/kg/day or about 50 mg/kg/day.

The method of introducing compounds containing the cupredoxin entry domain to patients is, in some embodiments, co-administration with other drugs known to treat cancer. Such methods are well-known in the art. In a specific embodiment, the compounds containing the cupredoxin entry domain are part of an cocktail or co-dosing containing or with other drugs for treating cancer. Such drugs include, for example, those listed herein and specifically 5-fluorouracil; Interferon α ; Methotrexate; Tamoxifen; and Vincristine. The above examples are provided for illustration only, many other such compounds are known to those skilled in the art.

Other drugs suitable for treating cancer include, but not limited to, alkylating agents such as nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosoureas, ethylenimines, and triazenes; antimetabolites such as folate antagonists, purine analogues, and pyrimidine analogues; antibiotics such as anthracyclines, bleomycins, mitomycin, dactinomycin, and plicamycin; enzymes such as L-asparaginase; farnesyl-protein transferase inhibitors; 5.alpha.-reductase inhibitors; inhibitors of 17.beta.-hydroxysteroid dehydrogenase type 3; hormonal agents such as glucocorticoids, estrogens/antiestrogens, androgens/antiandrogens, progestins, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonists, octreotide acetate; microtubule-disruptor agents, such as ecteinascidins or their analogs and derivatives; microtubule-stabilizing agents such as taxanes, for example, paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™), and their analogs, and epothilones, such as epothilones A-F and their analogs; plant-derived products, such as vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, taxanes; and topoisomerase inhibitors; prenyl-protein transferase inhibitors; and miscellaneous agents such as hydroxyurea, procarbazine, mitotane, hexamethylmelamine, platinum coordination complexes such as cisplatin and carboplatin; and other agents used as anti-cancer and cytotoxic agents such as biological response modifiers, growth factors; immune modulators and monoclonal antibodies. The compounds of the invention may also be used in conjunction with radiation therapy and surgery.

41

Representative examples of these classes of anti-cancer and cytotoxic agents include but are not limited to mechlorethamine hydrochloride, cyclophosphamide, chlorambucil, melphalan, ifosfamide, busulfan, carmustin, lomustine, semustine, streptozocin, thiotepa, dacarbazine, methotrexate, thioguanine, mercaptopurine, fludarabine, pentastatin, cladribin, cytarabine, fluorouracil, doxorubicin hydrochloride, daunorubicin, idarubicin, bleomycin sulfate, mitomycin C, actinomycin D, safracins, saframycins, quinocarcins, discodermolides, vincristine, vinblastine, vinorelbine tartrate, etoposide, etoposide phosphate, teniposide, paclitaxel, tamoxifen, estramustine, estramustine phosphate sodium, flutamide, buserelin, leuprolide, pteridines, diynes, levamisole, aflacon, interferon, interleukins, aldesleukin, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoin, irinotecan hydrochloride, betamethosone, gemcitabine hydrochloride, altretamine, and topoteca and any analogs or derivatives thereof.

Preferred members of these classes include, but are not limited to, paclitaxel, cisplatin, carboplatin, doxorubicin, carminomycin, daunorubicin, aminopterin, methotrexate, methopterin, mitomycin C, ecteinascidin 743, or pofiromycin, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurine, gemcitabine, cytosine arabinoside, podophyllotoxin or podophyllotoxin derivatives such as etoposide, etoposide phosphate or teniposide, melphalan, vinblastine, vincristine, leurosine, vindesine and leurosine.

Examples of anticancer and other cytotoxic agents useful to co-administer with the compositions of the invention include the following: epothilone derivatives as found in German Patent No. 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253 and WO 00/00485; cyclin dependent kinase inhibitors as found in WO 99/24416 (see also U.S. Pat. No. 6,040,321); and prenyl-protein transferase inhibitors as found in WO 97/30992 and WO 98/54966; and agents such as those described generically and specifically in U.S. Pat. No. 6,011,029 (the compounds of which U.S. patent can be employed together with any NHR

modulators (including, but not limited to, those of present invention) such as AR modulators, ER modulators, with LHRH modulators, or with surgical techniques, especially in the treatment of cancer).

Pharmaceutical compositions used in accordance with the present invention can be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries that facilitate processing of the composition, active agents, for inhibiting or stimulating the secretion of the composition, or a mixture thereof into preparations which can be used therapeutically.

Nucleic acid molecules encoding a cupredoxin entry domain or a fusion protein combining a either entry domain and a cargo compound can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (Nabel et al., U.S. Patent No. 5,328,470 1994. USA), or by stereotactic injection (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA, vol. 91, pp 3054-57 (1994)). The pharmaceutical preparation of a gene therapy vector can include an acceptable diluent or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that produce the gene delivery system.

In one aspect, the composition is delivered as DNA such that the complex is generated in situ. In one embodiment, the DNA is "naked," as described, for example, in Ulmer et al., Science 259:1745-49 (1993) and reviewed by Cohen, Science 259 1691-92 (1993). The uptake of naked DNA may be increased by coating the DNA onto a carrier, e.g. a biodegradable bead, which is efficiently transported into the cells. In such methods, the DNA may be present within any of a variety of delivery systems known to those of ordinary skill in the art, including nucleic acid expression systems, bacterial and viral expression systems.

Techniques for incorporating DNA into such expression systems are well known to those of ordinary skill in the art. See, e.g., WO90/11092, WO93/24640, WO 93/17706, and U.S. Pat. No. 5,736,524.

Vectors, used to shuttle genetic material from organism to organism, can be divided into two general classes: Cloning vectors are replicating plasmid or phage with regions that are non-essential for propagation in an appropriate host cell and into which foreign DNA can be inserted; the foreign DNA is replicated and propagated as if it were a component of the vector. An expression vector (such as a plasmid, yeast, or animal virus genome) is used to introduce foreign genetic material into a host cell or tissue in order to transcribe and translate the foreign DNA, such as the DNA of the composition. In expression vectors, the introduced DNA is operably-linked to elements such as promoters that signal to the host cell to transcribe the inserted DNA. Some promoters are exceptionally useful, such as inducible promoters that control gene transcription in response to specific factors. Operably-linking a composition polynucleotide to an inducible promoter can control the expression of the wt-azurin entry domain composition polypeptide or fragments. Examples of classic inducible promoters include those that are responsive to α -interferon, heat shock, heavy metal ions, and steroids such as glucocorticoids (Kaufman, Methods Enzymol. 185:487-511 (1990)) and tetracycline. Other desirable inducible promoters include those that are not endogenous to the cells in which the construct is being introduced, but, however, are responsive in those cells when the induction agent is exogenously supplied. In general, useful expression vectors are often plasmids. However, other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses) are contemplated.

Vector choice is dictated by the organism or cells being used and the desired fate of the vector. In general, vectors comprise signal sequences, origins of replication, marker genes, enhancer elements, promoters, and transcription termination sequences.

Kits Comprising a Cupredoxin Entry Domain-Cargo Compound Complex

In another aspect, the invention provides kits containing one or more of the following in a package or container: (1) a reagent comprising a complex of a cupredoxin entry domain linked to a cargo compound; (2) a reagent containing a

pharmaceutically acceptable adjuvant or excipient; (3) a vehicle for administration, such as a syringe; (4) instructions for administration.

Embodiments in which two or more of components (1) - (4) are found in the same container are also contemplated.

- 5 When a kit is supplied, the different components of the composition may be packaged in separate containers and admixed immediately before use. Such packaging of the components separately may permit long-term storage without losing the active components' functions.

- 10 The reagents included in the kit can be supplied in containers of any sort such that the life of the different components are preserved and are not adsorbed or altered by the materials of the container. For example, sealed glass ampules may contain lyophilized polypeptide or polynucleotide, or buffers that have been packaged under a neutral, non-reacting gas, such as nitrogen. Ampules may consist of any suitable material, such as glass, organic polymers, such as
- 15 polycarbonate, polystyrene, etc., ceramic, metal or any other material typically employed to hold similar reagents. Other examples of suitable containers include simple bottles that may be fabricated from similar substances as ampules, and envelopes, that may comprise foil-lined interiors, such as aluminum or an alloy. Other containers include test tubes, vials, flasks, bottles, syringes, or the like.
- 20 Containers may have a sterile access port, such as a bottle having a stopper that can be pierced by a hypodermic injection needle. Other containers may have two compartments that are separated by a readily removable membrane that upon removal permits the components to be mixed. Removable membranes may be glass, plastic, rubber, etc.

- 25 Kits may also be supplied with instructional materials. Instructions may be printed on paper or other substrate, and/or may be supplied as an electronic-readable medium, such as a floppy disc, CD-ROM, DVD-ROM, Zip disc, videotape, audiotape, flash memory device, etc. Detailed instructions may not be physically associated with the kit; instead, a user may be directed to an internet
- 30 web site specified by the manufacturer or distributor of the kit, or supplied as electronic mail.

A more complete understanding of the present invention can be obtained by reference to the following specific Examples. The Examples are described solely for purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the invention.

5 Changes in form and substitution of equivalents are contemplated as circumstances may suggest or render expedient. Although specific terms have been employed herein, such terms are intended in a descriptive sense and not for purposes of limitations. Modifications and variations of the invention as hereinbefore set forth can be made without departing from the spirit and scope

10 thereof, and, therefore, only such limitations should be imposed as are indicated by the appended embodiments.

EXAMPLES

Example 1 - Plasmid constructions

15 Plasmids expressing fusion glutathione S-transferase (GST)-truncated wt-azurin (azu) derivatives were constructed by a polymerase chain reaction using proofreading DNA polymerase. Figure 6 shows a schematic representation of various truncated wt-azurin constructs. For pGST-azu 36-128, an amplified PCR fragment was introduced into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of the commercial GST

20 expression vector pGEXSX (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855). The fragment was amplified with pUC19-azu as a template and primers, 5'-CGGGATCC CCG GCA ACC TGC CGA AGA ACG TCA TGG GC-3' (SEQ ID NO: 12) and 5'-CGGAATTC GCA TCA CTT CAG GGT CAG GG-3' (SEQ ID NO: 13), where the additionally introduced *Bam*HI and *Eco*RI sites are underlined

25 respectively. Carboxyl-terminus truncation of *azu* gene was cumulatively performed by introducing a stop codon using QuickChange site-direct mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA 92037).

For pGST-azu 36-50, pGST-azu 36-77 and pGST-azu 36-89, stop codons were introduced into Ser51, Ser78, and Gly90, respectively. The plasmid carrying

30 pGST-azu 36-128 was used as template DNA. Three sets of oligonucleotides for site-direct mutagenesis are shown as follows. For pGST-azu 36-50: 5'-GGC CAC

AAC TGG GTA CTG TGA ACC GCC GCC GAC ATG CAG-3' (SEQ ID NO: 14), and 5'-CTG CAT GTC GGC GGC GGT TCA CAG TAC CCA GTT GTG GCC-3' (SEQ ID NO: 15). For pGST-azu 36-77: 5'-CCT GAA GCC CGA CGA CTG ACG TGT CAT CGC CCA CAC C-3' (SEQ ID NO: 16) and 5'-GGT GTG
 5 GGC GAT GAC ACG TCA GTC GTC GGG CTT CAG G-3' (SEQ ID NO: 17). For pGST-azu 36-89: 5'-CCA AGC TGA TCG GCT CGT GAG AGAAGG ACT CGG TGA CC-3' (SEQ ID NO: 18), and 5'-GGT CAC CGA GTC CTT CTC TCA CGA GCC GAT CAG CTT GG-3 (SEQ ID NO: 19). The plasmids pGST-azu 50-77 and pGST-azu 67-77 were generated by PCR using pGST-azu 36-77 as
 10 a template DNA.

Amplified PCR fragments, azu 50-77 and azu 67-77, were obtained using forward primers 5'-CGGGATCC TGA GCA CCG CCG CCG ACA TGC AGG G-3' (SEQ ID NO: 20) and 5'-CGGGATCC CCG GCC TGG ACA AGG ATT ACC TGA AGC CCG-3 (SEQ ID NO: 21), where the additionally introduced
 15 *Bam*HI site is indicated by underlining. The reverse primer, 5'-CGGAATTC GCA TCA CTT CAG GGT CAG GG-3' (SEQ ID NO: 22), was utilized in both cases.

The plasmid carrying *gst-azu* 50-77 was used for generating pGST-azu 50-66 by introduction of a stop codon in Gly67 using oligonucleotides as follows: 5'-
 20 GAC GGC ATG GCT TCC TGA CTG GAC AAG GAT TAC C -3' (SEQ ID NO: 23), and 5'-GGT AAT CCT TGT CCA GTC AGG AAG CCA TGC CGTC- 3' (SEQ ID NO: 24). The green fluorescent protein gene (*gfp*) encoding the green fluorescent protein was also amplified by PCR. Forward and reverse primers used were 5'-CGGGATCC CCA TGG TGA GCA AGGGCG-3' (SEQ ID NO: 25) and
 25 5'-CGGAATTC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G-3' (SEQ ID NO: 26) containing *Bam*HI and *Eco*RI sites at the 5' end of each oligonucleotides. The resultant PCR fragment was ligated into the pGEXSX vector for creating pGST-GFP. For the preparation of plasmid DNA carrying *gst-gfp-azu* 50-77, the *azu* 50-77 gene was amplified by PCR with pGST-azu 50-77 as a template and primers 5'
 30 -CCGCTCGAG CCT GAG CAC CGC CGC CATGCA GGG-3' (SEQ ID NO: 27) and 5' -TTTTCCTTTTGCGGCCGC TCA GTC GTC GGG CTT CAG GTA

ATC C-3' (SEQ ID NO: 28), where the introduced *Xho* I and *Not* I sites are underlined respectively. Purified azu 50-77 fragment was introduced into pGST-GFP at *Xho* I and *Not* I unique restriction enzyme sites

5 Example 2 - Purification of Proteins

Wt-azurin and M44KM64E mutant azurin were prepared and purified as described by Yamada, T. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 101, pp. 4770-75 (2004), and in copending U.S. patent application serial number 10/720,603, the contents of which are incorporated by this reference. Briefly, the
10 wt-azurin gene was amplified by PCR according to the method described by Kukimoto *et al.*, FEBS Lett, vol. 394, pp 87-90 (1996). PCR was performed using genomic DNA from *P. aeruginosa* strain PAO1 as a template DNA.

The amplified DNA fragment of 545 bp, digested with *Hind*III and *Pst*I, was inserted into the corresponding sites of pUC19 so that the azurin gene was
15 placed downstream of the *lac* promoter to yield an expression plasmid pUC19-azuA. *E. coli* JM109 was used as a host strain for expression of the azurin gene. The recombinant *E. coli* strain was cultivated in 2YT medium containing 50 µg ml⁻¹ ampicillin, 0.1 mM IPTG; and 0.5 mM CuSO₄ for 16 h at 37°C to produce azurin.

20 For preparation of the M44KM64E mutant azurin, site-directed mutagenesis of the azurin gene was performed using a QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Mutations were confirmed by DNA sequencing.

Plasmid DNA, pET9a carrying the *rus* gene encoding the cupredoxin
25 rusticyanin from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, was obtained from Dr. Kazuhiko Sasaki, Central Research Institute of Electric Power Industry, Chiba, Japan.

Rusticyanin was isolated from *E. coli* BL21 (DE3) harboring the *rus* gene using the method of Sasaki, K., *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 67, pp. 1039-47 (2003) with some modifications. Briefly, acetic acid buffer (pH 4.0) and
30 CM-Sepharose (Sigma Chemicals, St. Louis, MO 63178) were used instead of beta-alanine buffer (pH 4.0) and TSK-gel CM-650 column (Tosoh Bioscience,

LLC, Montgomeryville, PA 18936). Two other purified cupredoxins, plastocyanin from *Phormidium laminosum* and pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* were obtained from Dr. Beatrix G. Schlarb-Ridley, University of Cambridge, UK and Dr. Christopher Dennison, University of Newcastle Upon Tyne, UK, respectively.

All recombinant GST-fusion derivatives were purified as follows: *E. coli* BL21 cells were used as the host strain. After induction with 0.4 mM IPTG at early log phase of growth in L broth, GST-fusion proteins were purified from cell extracts by using Glutathione Sepharose 4B affinity chromatography and Sephadex 75 gel-filtration column with PBS (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855). Purified proteins, wt azurin and GST-derivatives or other cupredoxins, labeled with ALEXA FLUOR® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR 97402) were isolated according to manufacturer's instructions. Unbound free fluorescent chemical was removed by gel-filtration column.

15

Example 3 - Cell cultures

J774 and UIISO-Mel-2 cells (available from Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, Maryland U.S.A.) were cultured as described in Yamada, T. *et al.* Infect. Immun. vol. 70, pp. 7054-62 (2002); Goto, M., *et al.* Mol. Microbiol. vol. 47, pp. 549-59 (2003); and Yamada, T., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 99, pp. 14098-103 (2002), the contents of which are incorporated by reference. Human normal fibroblast cells (stock culture collection of the Department of Surgical Oncology, University of Illinois at Chicago (UIC), Chicago) were cultured in MEM with Eagle's salt containing 2 mM L-glutamine, 0.1 mM MEM essential amino acids and supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 Units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. MCF-7 and MOF-10F cells were cultured as described in Punj *et al.* *Oncogene* 23:2367-78 (2004).

Example 4 - Co-culture of J774, UISO-Mel-2 and Fibroblast Cells and Confocal microscopy

J774, UISO-Mel-2, and fibroblast cells were cultured on individual cover slips. After overnight incubation, the cells were washed with fresh media and all
 5 three cell lines were placed on a culture dish containing 200 µg/ml of wt-azurin conjugated with ALEXA FLUOR® 568. The cells were then incubated for 0.5 or 3.5 h at 37°C under 5% CO₂.

For preparation of microscope samples, cells were cultured on cover-slips overnight at 37°C. Cultured cells were placed at 37°C or 4°C for 2 h before protein
 10 treatment. Pre-warmed 37°C fresh media or ice-cold 4°C fresh media were mixed with red-fluorescent (labeled with ALEXA FLUOR® 568) cupredoxins or GST-fusion derivatives, and incubated with the cells. The cells were washed with PBS, and fixed with methanol at -20°C for 5 min. After washing with PBS twice and the
 15 addition of mounting media containing 1.5 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for staining nuclei (VECTASHILD, Vector, Burlingame, CA), images were taken by a confocal microscope.

Example 5 – Entry of Cupredoxins Into J774 Cells

Wt-azurin, its mutant variant M44KM64E, plastocyanin, pseudoazurin and
 20 rusticyanin were incubated with J774 cells as in Example 4 and the cells examined using confocal microscopy. In these experiments, the cupredoxins were conjugated with ALEXA FLUOR® 568 to fluoresce red and incubated with the J774 cells for 1 hr at 37°C at a concentration of 200 µg/ml, and in a separate
 experiment wild type azurin and rusticyanin were incubated with J774 cells for 1
 25 hr at 37°C at a concentration of about 6 to 7 µM. The nucleus was stained blue with DAPI. A control without the proteins was maintained. In all cases, the cupredoxins were seen to enter into the cytosol of J774 cells. In similar
 experiments, auracyanin A and B enter preferentially to MCF7 cancer cells and not non-cancerous control cells.

30

Example 6 – Entry of Wt-azurin and Rusticyanin Into Various Cell Types

Wt-azurin exhibits a reduced cytotoxic activity towards MCF-10F cells as contrasted with the MCF-7 cells. Punj *et al. Oncogene* 23:2367-2378 (2004).

J774, peritoneal macrophages, mast cells, human breast cancer MCF-7 and human
5 normal epithelial MCF-10F cells (stock culture collection of the Department of Surgical Oncology, University of Illinois at Chicago (UIC), Chicago) were treated and examined as in Example 5 and tested to determine if wt-azurin could enter such cells.

Wt-azurin was internalized in J774 cells during 45 min incubation.

10 However, it was internalized very inefficiently in peritoneal macrophages or mast cells. Even after 6 hr incubation, such cells showed only limited entry. Similarly, while wt-azurin entered the breast cancer MCF-7 cells efficiently, it showed an extremely reduced rate of entry in the normal mammary MCF-10F cells.

Alexa fluor[®]-conjugated azurin entered efficiently in UISOMel-2 and
15 MCF-7 cancer cells but not in the normal mammary MCF 10A1 cells. Alexa fluor[®]-conjugated rusticyanin, however, not only entered the cytosol of UISO-Mel-2 and MCF-7 cancer cells, but also in the normal MCF 10A1 cells. Unlike in the cancer cells where rusticyanin was evenly distributed in the cytosol, in MCF10A1 cells, much of the rusticyanin was sequestered in the perinuclear space
20 surrounding the nucleus.

Example 7 – Wt azurin-mediated Cytotoxicity and Growth Inhibition

To further assess the specificity of entry of wt-azurin in various cells, we determined the entry of Alexa fluor-conjugated wt-azurin in J774, UISO-Mel-2
25 and normal fibroblast cells during incubation at 37°C for 30 min and 3.5 hr. Wt-azurin was seen to enter rapidly in J774 and UISO-Mel-2 cells in 30 min; very little wt-azurin was seen in the cytosol of fibroblasts during this period. After 3.5 hr of incubation, only small amounts of wt-azurin were found in the fibroblasts.

A 3(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 tetrazolium bromide (MTT) assay was
30 performed for the measurement of the cytotoxicity of wt-azurin as described by Yamada, T., *et al. Infect. Immun.* 70:7054-62 (2002), Goto, M., *et al. Mol.*

Microbiol 47:549-59 (2003), and in co-pending U.S. patent application serial number 10/720,603, filed November 24, 2003, the contents of which are incorporated by reference. Figure 1(b) shows that significant wt-azurin-mediated cytotoxicity was observed only with J774 and UISO-Mel-2 cells during 24 hr incubation.

M44KM64E mutant azurin showed very little apoptosis -inducing activity in J774 cells but at 1 mg/ml concentration significantly inhibited (about 95%) cell cycle progression at the G₁ to S phase. Cell cycle progression was analyzed by flow cytometry, as described by Hiraoka, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101:6427-32 (2004) and Yamada, T. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:4770-75 (2004), the contents of which are incorporated by reference. Figure 1(a) shows that when the fibroblasts were treated with 500 µg/ml or 1 mg/ml of M44KM64E mutant azurin, the extent of inhibition of cell cycle progression was about 20%.

Example 8 – Microinjection of Wt-azurin into Fibroblast and MCF-10F cells

Wt-azurin was microinjected into fibroblast and MCF-10F cells as using the method described by Punj, V., *et al.*, *Oncogene* 23:2367-78 (2004). Cells were examined for induction of apoptosis, leading to nuclear DNA condensation and fragmentation. Significant nuclear DNA (labeled blue with DAPI) condensation and fragmentation were observed in microinjected single cells after 5 hr incubation with wt-azurin, but not during a 30 min. incubation with azurin.

Example 9 – Internalization of Wt-azurin Fusion Derivatives at 37°C

A series of GST fusions of wt-azurin truncated at both the N- and the C-terminal were prepared and purified as in Example 1 (Figure 2(a) and 2(b)). Using ALEXA FLUOR[®] 568 conjugated wt-azurin, GST and GST-azu fusion derivatives, internalization in J774 cells at 37°C during 1 hr incubation was examined using the method described in Example 5. The nucleus was stained blue with DAPI.

While wt-azurin was internalized, GST remained at the periphery of the cells and was not internalized. GST-azu 36-128 and GST-azu 36-89 were internalized, as was GST-azu 36-77. Further truncations, however, demonstrated that while GST-azu 50-77 was internalized, GST-azu 36-50 was highly inefficient and appeared to form clumps on the surface.

Example 10 - Internalization of Azurin Fusion Derivatives at 4°C

Internalization of wt-azurin and the GST-azu fusion derivatives in J774 cells incubated at 4°C was examined. At 4°C, internalization of wt-azurin inside J774 cells during 1 hr incubation was severely impaired. Similar impairment was also seen with GST-azu 36-128 and GST-azu 36-89. The shorter GST-azu 36-77, GST-azu 50-77, GST-azu 50-66 and GST-azu 67-77 demonstrated severe impairment of internalization at 4°C.

Example 11 - Energy-Dependent Internalization of the GST-GFP-azu 50-77 Fusion Protein in J774 and Melanoma UIO-Mel-2 Cells

GST was fused with GFP to make a GST-GFP fusion derivative. Additionally, azu 50-77 was fused to the GST-GFP (M_r 53 kDa) fusion protein (Figure 3(a)). The mobility of the purified GST, GST-GFP and GST-GFP-azu 50-77 fusion derivatives was examined on SDS-PAGE (Figure 3(b)). Detection was by Coomassie Blue staining and Western blotting using anti-azurin antibody (Figure 3(c))

Flow cytometric determination of J774 cells treated with varying concentrations of GST-GFP showed that this protein does bind to J774 cells. Flow cytometric separation of J774 cells treated with increasing concentrations of GST-GFP-azu 50-77 fusion protein demonstrated significantly reduced fluorescence than GST-GFP alone (Figure 4). It is to be noted that internalization of GFP in mammalian cells is known to lead to loss of fluorescence. This reduction of fluorescence is also apparent when J774 cells are treated with 200 µg/ml of GST-GFP-azu 50-77 fusion protein and incubated for increasing periods of time at 37°C.

To determine if there is any difference in the binding and internalization profile of GST-GFP and GST-GFP-azu 50-77, both J774 and UISO-Mel-2 cells were incubated with GST-GFP and GST-GFP-azu 50-77 at 37°C and at 4°C. The green fluorescence was localized using confocal microscopy. In J774 cells, GST-GFP fusion protein bound to the surface and was not internalized both at 37°C and at 4°C. In contrast, GST-GFP-azu 50-77 was found to be internalized at 37°C, but not at 4°C. In UISO-Mel-2 cells, the GST-GFP fusion protein was retained on the surface both at 37°C and at 4°C. In contrast, similar to J774 cells, GST-GFP-azu 50-77 fusion protein was seen to be internalized at 37°C but not at 4°C.

10

Example 12 – Wt-azurin Entry into Mammalian Cells by a Cell Membrane Penetration and an Endocytic Mechanism

If wt-azurin entry is solely dependent on receptor-mediated endocytosis, it could be blocked by protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), a mitochondrial uncoupler of energy generation, or preincubation with unlabeled azurin or other cupredoxins that block the receptors. J774 and UISO-Mel-2 cells were incubated with the cupredoxins at 10 fold excess concentration for 2 hr at 4°C, the cells washed thoroughly to remove the cupredoxins, and incubated with ALEXA FLUOR[®] 568-conjugated azurin for 1 hr at 37°C. There was as much internalized azurin as in cells not treated with the cupredoxins. The effects of cytochalasin D (available from Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo 63195), a known inhibitor of receptor-mediated endocytosis that disrupts the cellular microfilament network, and Brefeldin A (available from Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo 63195), which is known to disrupt the Golgi apparatus and inhibit classical vesicle-mediated secretion, were also tested. CCCP at 20 pM concentration significantly reduced the uptake of azurin in UISO-Mel-2 cells as did 0.25 to 0.5 pM cytochalasin D. Brefeldin A, on the other hand, had no significant effect.

15

20

25

Example 13 - Entry of a GST-PEDIII-azu 50-77 Fusion Derivative into UIISO-Mel-2 Cells

A GST-fusion of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A domain III (PEDIII) was constructed as described by Hwang, J. *et al.*, *Cell* 48:129-36 (1987); Reiter, Y. and Pastan, I., *Trends Biotechnol.* 16:513-20 (1998). This GST-PEDIII fusion derivative contained amino acids 381-613 of the exotoxin A. PEDIII is known to harbor ADP-ribosyl transferase activity and inhibits cellular protein synthesis in eukaryotic cells by inhibiting eukaryotic elongation factor 2.

Using PCR as described for the GST-GFP-azu 50-77, the azu 50-77 sequence was introduced to the carboxyl end of the GST-PEDIII fusion protein (Figure 5(a)). These two fusion proteins (GSTPEDIII and GST-PEDIII-azu 50-77) were purified by glutathione-sepharose 4B column chromatography as 52 and 54 kDa proteins (Fig. 5(b)). UIISO-Mel-2 and normal fibroblast (FBT) cells were then incubated for 24 h at 37°C with various concentrations of these proteins and the extent of cell death measured by MTT assay as described in Example 7.

While GST-PEDIII demonstrated only low cytotoxicity, the GST-PEDIII-azu 50-77 fusion protein had high cytotoxicity because of efficient entry to UIISO-Mel-2 cells (Figure 5(c)). In contrast, the fusion proteins demonstrated a low level of cytotoxicity towards the fibroblast cells.

Example 14 - Destabilization of the α -helix in wt-Azurin has no Substantial Effect on Its Internalization in UIISO-Mel-2 Cells

To examine if the α -helix plays a role in azurin entry, three helix-destabilizing proline residues were introduced in positions 54, 61 and 70 of wt-azurin (Figure 6) and examined the entry of the full length A54PT61PK70P mutant azurin into UIISO-Mel-2 cells. Single and double mutations in these positions were also constructed and tested for entry. The A54PT61PK70P mutant azurin was prepared by site-directed mutagenesis of the azurin gene using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA).

The mutants were incubated at 200 μ g/ml with UIISO-Mel-2 cells for 1 hr at 37°C, after which the fluorescence was localized by confocal microscopy. In all

cases, the ALEXA FLUOR[®] 568-conjugated mutant azurins entered UIISO-Mel-2 cells. Similarly, when the GST-GFP-azu 50-77 fusion protein, as well as its triple A54PT61PK70P azu mutant variant, were examined for entry in UIISO-Mel-2 cells, no significant difference was observed.

5

Example 15 - Entry of a GST-PEDIII-Rusticyanin Fusion Derivative into UIISO-Mel-2 Cells

A GST-fusion of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A domain III (PEDIII) and was constructed as in Example 13. Using PCR as described for the GST-GFP-azu 50-77, full-length rusticyanin sequence was introduced to the carboxyl end of the GST-PEDIII fusion protein. The fusion protein was purified by glutathione-sepharose 4B column chromatography. UIISO-Mel-2 and FBT cells were then incubated for 24 h at 37°C with various concentrations of the fusion protein and the extent of cell death measured by MTT assays as described in Example 7.

The GST-PEDIII- rusticyanin fusion protein exhibited high cytotoxicity against UIISO-Mel-2 cells (Figure 7). In contrast, the fusion protein demonstrated only a low level of cytotoxicity towards the FBT cells.

Example 16 – Competition of Azurin with GST-Azu 55-77 for Entry into J774 Cells.

A competition experiment was performed with unlabeled azurin at 37°C in presence of 7 µM Alexa fluor[®] - conjugated GST-azu 50-77. J774 cells were incubated without Alexa fluor[®]-conjugated azurin, with Alexa fluor[®]-conjugated GST-azu 50-77 (7 µM) and with Alexa fluor-conjugated GST-azu 50-77 (7 µM) in presence of 7, 14 and 56 µM of unlabeled azurin for 1 h at 37°C before determining GST-azu 50-77 entry. The results clearly demonstrated that in comparison to labeled 7 µM GST-azu 50-77 alone, the presence of increasing amounts of unlabeled azurin (7, 14 and 56 µM) increasingly competed with the entry of labeled 7 µM GST-azu 50-77. In contrast, when similar concentrations of

(6, 12 and 48 μ M) unlabeled rusticyanin were used in presence of labeled GST-azu 50-77, very little effect on the entry of GST-azu 50-77 was seen.

Example 17 – Sequence and Structural Comparison of Azurin Protein

5 Transduction Domain (PTD) with other Cupredoxins

The sequence identity between azurin and rusticyanin in the azu 50-77 region is less than 20%, as is true of several other cupredoxins (De Rienzo *et al.*, Protein Science 9:1439-1454, 2000; Murphy *et al.*, J. Mol. Biol. 315:859-871, 2002). A structural analysis using VAST algorithm (Gibrat *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. 6:377-385, 1996) between azurin and several members of the cupredoxin family demonstrated a significant identity between azu 50-77 region and that of the cupredoxin auracyanin B, a cupredoxin from the green thermophilic photosynthetic bacterium *C. aurantiacus* (Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 306:47-67, 2001). Other members of the cupredoxin family, while demonstrating structural similarity with other regions of azurin lacked significant identity with the azurin PTD, amino acids 50-77 (Fig. 8(a)). Indeed, when compared with other proteins whose structures have been deposited in the protein database, there was very little structural similarity between the azu PTD and other proteins.

A multiple amino acid sequence alignment of the residues in the *P. aeruginosa* PTD region with known sequences of other bacterial azurins from pathogens using the CLUSTAL X alignment program (Higgins and Sharp, *id.* 1988). While the phytopathogenic *P. syringae* azurin showed high identity with *P. aeruginosa* azurin PTD region, an azurin-like protein from *Neisseria meningitidis* (Gotschlich and Seiff, *FEMS Microbiol. Lett.* 43:253-255 (1987); Kawula *et al.*, *Mol. Microbiol.* 1:179-185 (1987); Cannon, *Clin. Microbiol. Rev.* 2:S1-S4 (1989)) also showed significant identity with the PTD domain of *P. aeruginosa* azurin, as did azurins from *Vibrio parahaemolyticus* and *Bordetella bronchiseptica* (Fig. 8(b)). A motif sequence D-G-X-X-X-X-X-D-X-X-Y-X-K-X-X-D (SEQ ID NO: 35) was found conserved in all these azurins.

30

Example 18 – *N. meningitidis* Laz (H8-azurin) induces cell death in the brain tumor cell line LH229

Neisseria meningitidis (Nm) causes cerebrospinal meningitis by disseminating in the blood stream, crossing the blood brain barrier, presumably by a transcellular route through brain endothelial cells, and invading the meninges. The azurins from both *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* have similar structures and high amino acid sequence homology (>50%). In addition, the *N. meningitidis* azurin is part of a longer polypeptide, Laz (SEQ ID NO: 30), which harbors in its N-terminal a surface peptide called H.8, which is present in the outer membrane of *N. meningitidis* (Cannon, J.G., Clin. Microbiol. Rev. vol. 2, pp. 51-54 (1989)). The surface-exposed H8 antigenic epitope also carries a signal for lipidation. The complete *N. meningitidis* H8 outer membrane protein remains on the external surface of *N. meningitidis* cells.

The *Neisseria gonorrhoeae* Laz protein is very similar to the *N. meningitidis* Laz protein. The *N. gonorrhoeae* laz gene was cloned into *E. coli*, and then the laz gene in the *E. coli* was hyper-expressed to produce the Laz protein (Fig. 13). The ability of the purified *P. aeruginosa* azurin and the purified *N. gonorrhoeae* Laz protein to induce cell death in the brain tumor cell line LH229 as measured by the MTT assay (Yamada, T., et al., Cell Cycle vol. 3, pp. 1182-1187 (2004)).

While *P. aeruginosa* azurin, when expressed in *E. coli*, is present in the periplasm, the Laz protein, when expressed in *E. coli*, was found in the outer membrane of *E. coli*. Additionally, while azurin had very low cytotoxicity towards the brain tumor cells within 24 hours, Laz showed high cytotoxicity, allowing the death of 90% of the brain tumor cells in 24 hours (Table 3). Azurin did show increasing cytotoxicity over 48 hours (Table 4). This experiment indicates that *P. aeruginosa* azurin and the *N. gonorrhoeae* H8-azurin (Laz, SEQ ID NO: 36) will be useful to diagnose and/or treat brain tumors *in vitro* and *in vivo*.

If Laz reduces brain tumor growth *in vivo*, all or part of the protein will be used as the "cupredoxin entry domain" of the invention to transport cargo

molecules, including fluorescent or radioactive tags or tumor-killing drugs/toxins, into the brain, and into brain tumor cells for diagnostic or therapeutic purposes.

5 **Table 3. Cytotoxicity of *P. aeruginosa* azurin and *N. gonorrhoeae* Laz to Brain Cancer Cell Line LH229 After 24 Hours Incubation.**

Protein	Conc.	Cytotoxicity (%)	STDEV
<i>P. aeruginosa</i> azurin	0	0.00	0.00
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	0	0.00	0.00
<i>P. aeruginosa</i> azurin	25	5.86	2.45
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	25	18.80	1.26
<i>P. aeruginosa</i> azurin	50	5.48	2.43
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	50	23.59	1.57
<i>P. aeruginosa</i> azurin	100	6.00	4.13
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	100	41.02	1.49
<i>P. aeruginosa</i> azurin	200	8.27	4.79
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	200	78.99	2.06
<i>P. aeruginosa</i> azurin	400	7.25	3.69
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	400	94.69	0.87
<i>P. aeruginosa</i> azurin	800	13.22	7.67
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	800	98.36	0.62

Table 4. Cytotoxicity of *P. aeruginosa* azurin and *N. gonorrhoeae* Laz to Brain Cancer Cell Line LH229 After 48 Hours of Incubation.

Protein	Conc. (µg/ml)	Cytotoxicity (%)	STDEV
<i>P. aeruginosa</i> azurin	0	0.00	0.00
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	0	0.00	0.00
<i>P. aeruginosa</i> azurin	25	11.65	1.07
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	25	20.04	4.25
<i>P. aeruginosa</i> azurin	50	8.55	2.51
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	50	25.52	1.80
<i>P. aeruginosa</i> azurin	100	16.19	2.60
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	100	39.72	0.92
<i>P. aeruginosa</i> azurin	200	16.30	1.81
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	200	87.01	1.21
<i>P. aeruginosa</i> azurin	400	61.96	19.15
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	400	98.75	0.96
<i>P. aeruginosa</i> azurin	800	82.71	5.91
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	800	99.93	0.12

10

Example 19 – Cytotoxicity of the *N. gonorrhoeae* Laz protein to Brain Tumor Cells

Several plasmids were constructed encoding protein constructs including *P. aeruginosa* azurin, *N. gonorrhoeae* Laz (SEQ ID NO:36), and fusion proteins, and the proteins tested in the MTT assay with brain tumor cell lines. The protein constructs tested include the *N. gonorrhoeae* Laz H.8 region alone, *P. aeruginosa* azurin alone, *N. gonorrhoeae* azurin alone, and the constructs depicted in Figure 10. The plasmids encoding the protein constructs are transformed into *E. coli* or another suitable expression system, and the protein constructs expressed and the resulting proteins purified. Brain tumor cell lines include NL229 and CCF-STTG1.

The results of this experiment indicate that the H.8 region and/or the azurin of the Laz gene are required to allow the protein construct to be cytotoxic to brain tumor cells. This experiment also determines if other azurins will be more cytotoxic to brain tumor cells if fused to the H.8 region. The results of this experiment indicate that the H.8 region can adapt a cupredoxin to be cytotoxic to brain cancer cell by transporting the attached azurin into the brain cancer cells. Accordingly, H.8 can be used as a transport domain to transport a cargo molecule(s) into brain cancer cells. Useful cargos include cancer treatments and diagnostic agents as known in the art and set forth herein.

Example 20 - Treatment Of Patients Suffering From Cancer

A Phase I/II clinical trial of a cupredoxin entry domain-exotoxin A domain III fusion (Study Drug) will be performed in patients suffering from cancer. Specifically, the cupredoxin entry domain is the 50-67 amino acid region from *Pseudomonas aeruginosa* and the cargo is the exotoxin A domain III from *Pseudomonas aeruginosa*, making the fusion protein "PEDIII-azu 50-67." This fusion protein will be constructed as illustrated in Example 13.

Forty-nine adult patients with histologically verified cancers of the breast, colon and melanoma who demonstrate clinical and radiographic progression or recurrence following adequate treatment by currently available FDA-approved chemotherapeutic drugs and regimen will be enrolled in an open-label prospective study administering the Study Drug. To be eligible for enrollment in the study, all

patients demonstrate increasing volume of measurable tumor after completion of approved course of chemotherapy regimens. The evidence of persistent metastatic deposits and/or continued increase in size or volume must be histologically established. This histological proof can be obtained by a fine needle aspiration
5 (FNA) biopsy.

The treatment program will be instituted after obtaining informed consent from all patients in accordance with the Institutional Review Board of the University of Illinois, Chicago and the FDA. The patients will have no intercurrent illness such as other malignancy, history of previous malignancy, blood
10 dyscrasias, insulin dependent diabetes or other serious cardiovascular diseases which might interfere in appropriate evaluation of the effects of the proposed therapy. Baseline blood work (Complete Blood Counts [CBC] and Serum Chemistry) including liver function studies (LFT) will be performed prior to initiation of therapy. All eligible patients must not receive any cancer
15 chemotherapy concurrently during the period of the trial.

The study drug(s) will be administered by daily intravenous injection of a pharmaceutically acceptable preparation of the Study Drug for 12 weeks and the subjects will be observed for any dose limiting toxicity. There will be 7 dose levels starting with 10 mg/kg/day and increasing by 5 mg/kg/day up to a
20 maximum dose of 50 mg/kg/day. The efficacy of each dose level will be recorded in 7 patients with advanced measurable cancer (breast, colon, and melanoma).

The response will be estimated by measuring the measurable tumor in 2 dimensions (a and b). 1) Total disappearance of the target metastatic tumors will be considered as complete response (CR); 2) A 75% reduction will be considered
25 excellent, partial response (PR); and 3) A good response (PR) will be post treatment reduction in size by 50%. 4) Reduction of 25% in size will be considered as stable disease (SD) and 5) < 25% will be considered as no response (NR). Patients demonstrating a progression of disease will have their treatment discontinued but will be followed for an additional 12 weeks.

30 Total disappearance, and any reduction in size of the target metastatic tumors will indicate that the azurin treatment is effective for treating cancer.

Other indications that the azurin treatment is effective are a decrease rate of in the appearance of new metastatic tumors and a decrease in the angiogenesis associated with tumors.

5 Various modifications and variations of the described examples and systems of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific
10 embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in related fields are intended to be within the scope of the following claims.

CLAIMS:

1. A peptide, consisting of a sequence that has at least about 90% amino acid sequence identity to less than a full-length wild-type cupredoxin or H.8 outer membrane protein, and which facilitates the entry of a linked molecule into a mammalian cancer cell.
2. The peptide of claim 1, wherein the cupredoxin is selected from the group consisting of azurin, plastocyanin, rusticyanin, pseudoazurin, auracyanin and azurin-like protein.
3. The peptide of claim 1, wherein the peptide is derived from a organism selected from the group consisting of *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Chloroflexus aurantiacus* and *Neisseria gonorrhoeae*.
4. The peptide of claim 1, wherein the cupredoxin is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 and SEQ ID NO: 43.
5. The peptide of claim 1, which is at least about 10 residues and not more than about 50 residues in length.
6. The peptide of claim 1, comprising a sequence which has at least about 90% amino acid sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ

ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, and SEQ ID NO: 47.

7. The peptide of claim 6, comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, and SEQ ID NO: 47.

8. The peptide of claim 6, consisting of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, and SEQ ID NO: 47.

9. The peptide of claim 1, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of

DGXXXXDXXYXKXXD and DGXXXXDXXYXKXXD;

wherein D is aspartic acid, G is glycine, Y is tyrosine, K is lysine and X is any amino acid.

10. A peptide which has significant structural homology to the 50-77 amino acid region of *Pseudomonas aeruginosa* azurin and which facilitates the entry of a linked molecule into a mammalian cancer cell.

64

11. A complex comprising a cargo compound and a peptide, wherein the peptide has at least about 90% sequence identity with a cupredoxin, or a fragment thereof, wherein the peptide, or fragment thereof, is linked to the cargo compound, and wherein the peptide facilitates entry of the cargo compound into a mammalian cancer cell.
12. The complex of claim 11, wherein the peptide is the peptide of claim 1.
13. The complex of claim 11, wherein the cargo compound is selected from the group consisting of a protein, lipoprotein, polypeptide, peptide, polysaccharide, nucleic acid, dye, microparticle, nanoparticle, toxin and drug.
14. The complex of claim 13, wherein the cargo compound is selected from the group consisting of a protein and a polypeptide and wherein the peptide is linked to the cargo compound to form a fusion protein.
15. The complex of claim 11, wherein the cargo compound is a toxin.
16. The complex of claim 15, wherein the toxin is *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A or a fragment thereof.
17. The complex of claim 11, wherein the cargo compound is a detectable substance.
18. The complex of claim 17, wherein the detectable substance is detectable by a method selected from the group consisting of fluorimetry, microscopy, X-ray CT, MRI and ultrasound.

19. A pharmaceutical composition comprising the complex of claim 11 with a pharmaceutically suitable carrier.
20. A method comprising contacting a cell or cells with the complex of claim 11.
21. The method of claim 20, wherein the cell or cells originate from a patient suffering from cancer, and further comprising reintroducing the cell or cells into the patient.
22. The method of claim 20, wherein the cell is a cancer cell.
23. The method of claim 22, wherein the cell is a cancer cell selected from the group consisting of osteosarcoma cell, lung carcinoma cell, colon carcinoma cell, lymphoma cell, leukemia cell, soft tissue sarcoma cell, breast carcinoma cell, liver carcinoma cell, bladder carcinoma cell, melanoma cell, brain tumor cell and prostate carcinoma cell.
24. A method of treating a patient with cancer, wherein the complex of claim 11 is administered to said patient in a therapeutically effective amount.
25. The method of claim 24, wherein the complex is administered in a manner selected from the group consisting of intravenously, topically, subcutaneously, intramuscularly, and into tumor.
26. The method of claim 24, wherein the complex is co-administered with another cancer treatment.

27. A method for imaging cancer in a patient, wherein the complex of claim 17 is administered to said patient, and the location of the cargo compound is detected.
28. The method of claim 27, wherein the cargo compound is an X-ray contrast agent and the location of the cargo compound is detected by X-ray CT.
29. The method of claim 27, wherein the cargo compound is a magnetic resonance imaging contrast agent and the location of the cargo compound is detected by MRI.
30. The method of claim 27, wherein the cargo compound is an ultrasound contrast agent and the location of the cargo compound is detected by ultrasound imaging.
31. A method for diagnosing cancer, wherein a cell is contacted with the complex of claim 17 and the location of the cargo molecule is detected.
32. A kit comprising a reagent comprising the complex of claim 11.
33. The kit of claim 32, further comprising a reagent comprising a pharmaceutically-acceptable adjuvant or excipient.
34. The kit of claim 32, further comprising a vehicle for administration of the reagent.
35. The peptide of claim 1, wherein the structure of the peptide is modified to extend or optimize the half life of the peptide in the bloodstream.

36. A nucleic acid molecule, which encodes the peptide of claims 1 or 10, or the complex of claim 14.

CUPREDOXIN DERIVED TRANSPORT AGENTS AND METHODS OF USE THEREOF

ABSTRACT

The present invention discloses methods and materials for delivering a cargo compound into a cancer cell. Delivery of the cargo compound is accomplished by the use of protein transduction domains derived from cupredoxins. *The invention further discloses methods for treating cancer and diagnosing cancer.*

PCT/US05/35758

FIG.1a

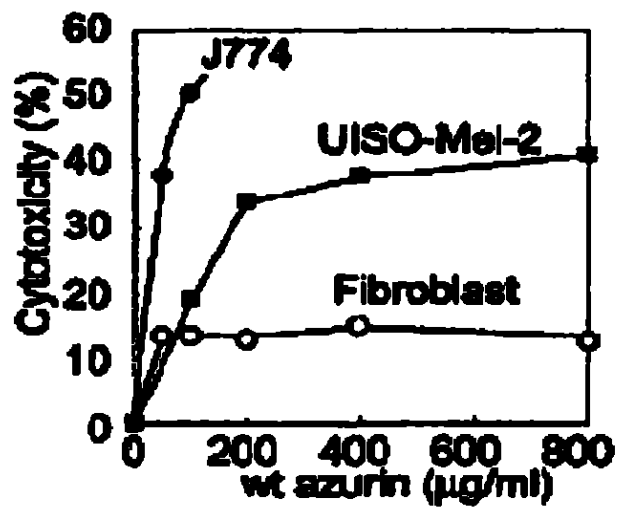
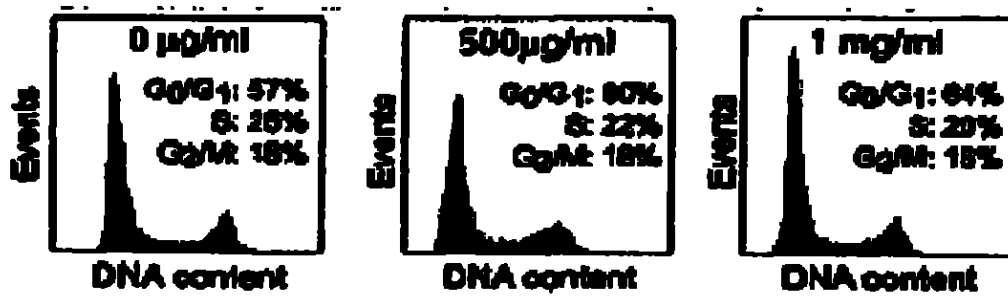


FIG.1b



PCT/US05/35758

FIG. 2a

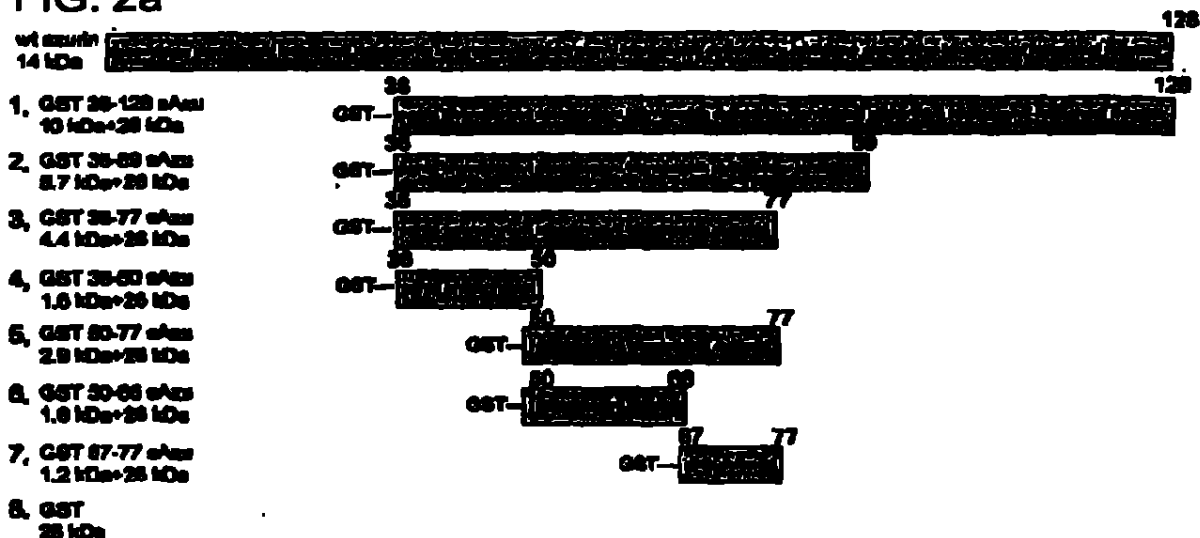


FIG. 2b



2/10

FIG. 3a

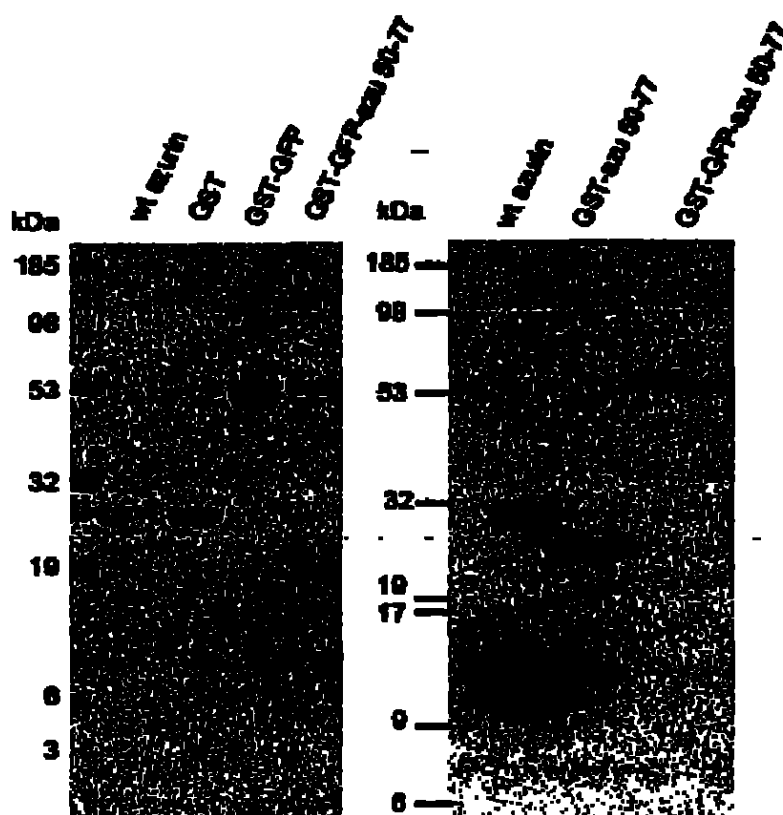


FIG. 3b

FIG. 3c

PC711105/36/530

01/10

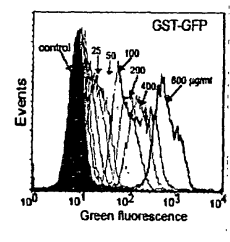


FIG. 4a

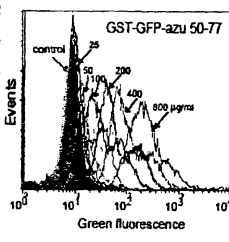


FIG. 4b

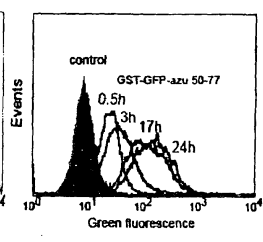


FIG. 4c

pk

FIG. 5a

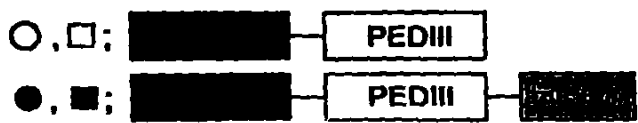


FIG. 5b

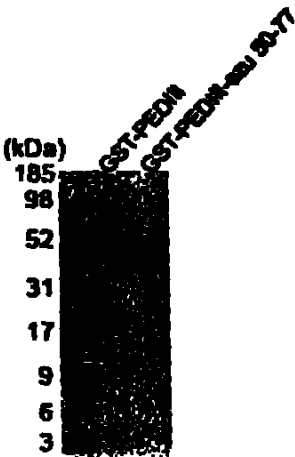
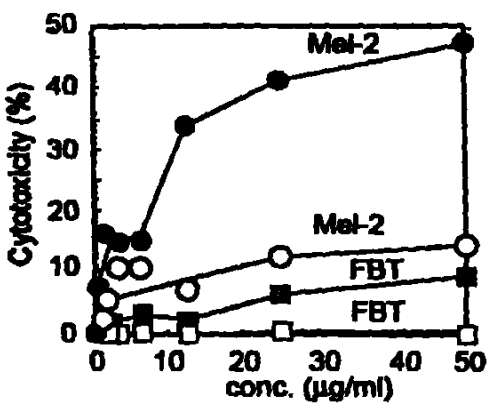


FIG. 5c



PCT/US05/35758

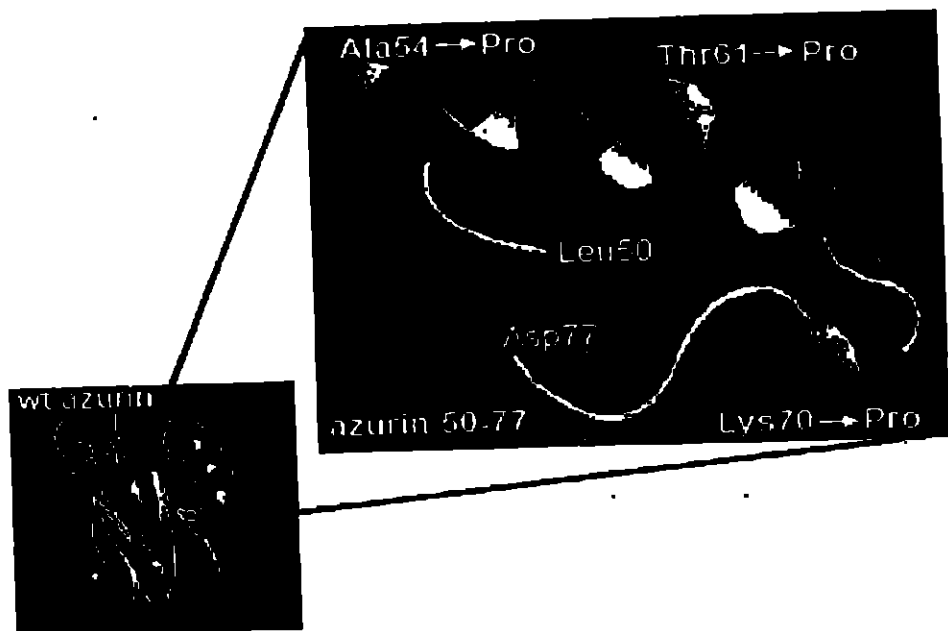


FIG. 6

PCT/US05/35758

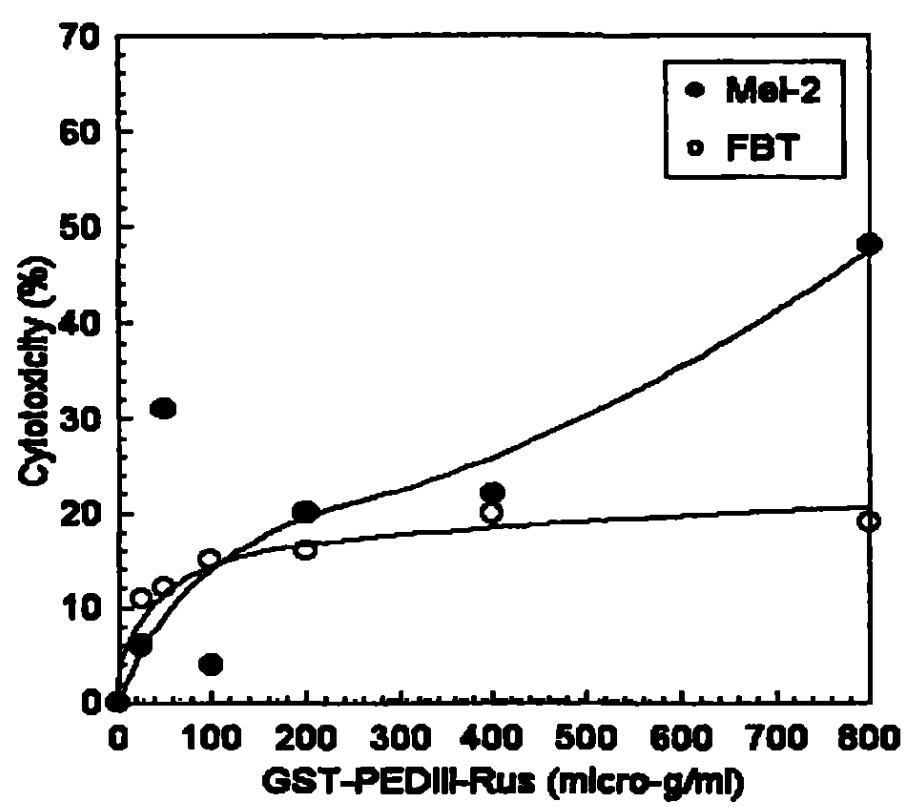


FIG. 7

7/10

PCT/US05/35758

FIG. 8a



FIG. 8b

Microorganism	Accession number
Psa	AA000307 (51) -STAADNQGVVTDGNASGLDKDYLPDD (77)
Psa	AA050351 (51) -SKKADASAITTDGMSVGIIDNDYVKPDD (77)
Psa	AA041008 (89) IAKAEDMDGVFDGVGA-AUTDYVKPDD (115)
Vip	NP_800938 (52) -ADTANIQAVGTDGMSAGADNSYVKPDD (78)
Bo	AZER (51) -TKTADMQAVEKQGLAAGLENGYLPKGD (77)
Consensus	DG D Y K D

8/10

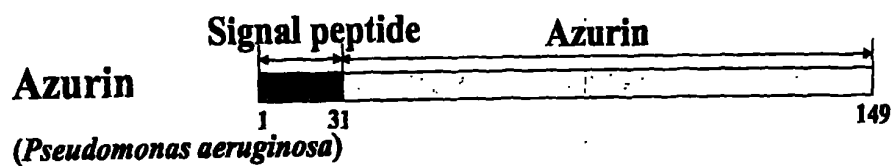
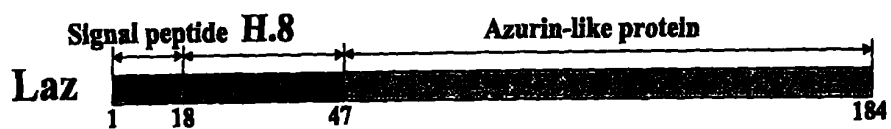


FIG. 9

PRIOR ART

PCT/US05/35758

9/10

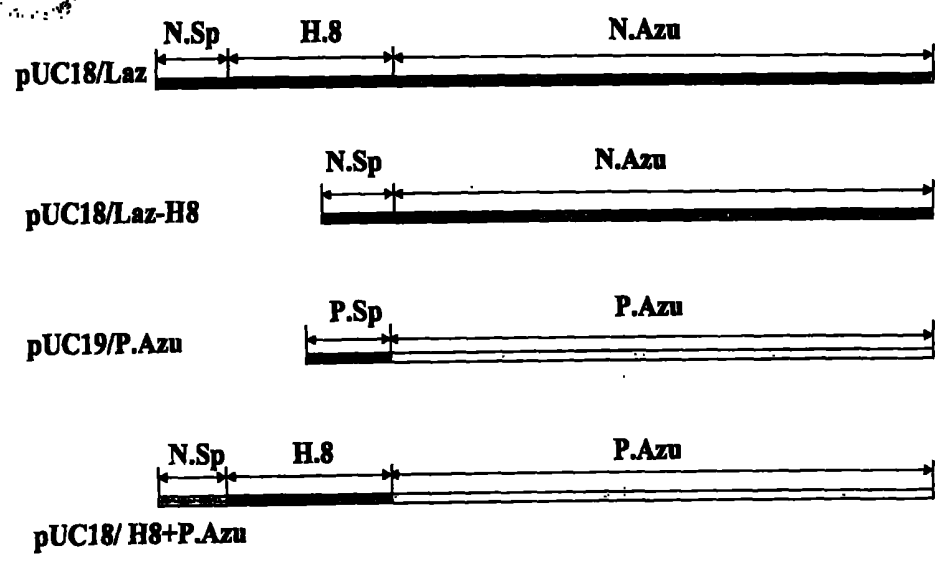
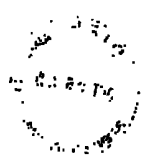


FIG. 10

PC170505/35758

10/10

PCT/US05/35750

SEQUENCE LISTING

<110> Chakrabarty, Ananda
Das Gupta, Tapas
Yamada, Tohru
Fialho, Arsenio

<120> Cupredoxin Derived Transport Agents and Methods of Use Thereof

<130> 51282-00009

<140> Not assigned
<141> 2005-10-06

<150> 60/616,782
<151> 2004-10-07

<150> 60/680,500
<151> 2005-05-13

<150> 60/700,297
<151> 2005-07-19

<160> 48

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 1

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Gln Gly Asn Asp Gln Met Gln Phe Asn
1 5 10 15

Thr Asn Ala Ile Thr Val Asp Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Ser His Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met
50 55 60

Ala Ser Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val
65 70 75 80

Ile Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr
85 90 95

PCT/US05/35758

Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys
100 105 110

Thr Phe Pro Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Thr Leu Lys
115 120 125

<210> 2
<211> 105
<212> PRT
<213> Phormidium laminosum

<400> 2

Glu Thr Phe Thr Val Lys Met Gly Ala Asp Ser Gly Leu Leu Gln Phe
1 5 10 15

Glu Pro Ala Asn Val Thr Val His Pro Gly Asp Thr Val Lys Trp Val
20 25 30

Asn Asn Lys Leu Pro Pro His Asn Ile Leu Phe Asp Asp Lys Gln Val
35 40 45

Pro Gly Ala Ser Lys Glu Leu Ala Asp Lys Leu Ser His Ser Gln Leu
50 55 60

Met Phe Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Glu Ile Thr Phe Ser Ser Asp Phe
65 70 75 80

Pro Ala Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Cys Ala Pro His Arg Gly Ala Gly
85 90 95

Met Val Gly Lys Ile Thr Val Glu Gly
100 105

<210> 3
<211> 155
<212> PRT
<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 3

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

Ala Met Leu Glu Lys Asp Thr Gly Lys Val Ser Gly Asp Thr Val Thr
20 25 30

PCT/US05/3575R

Tyr Ser Gly Lys Thr Val His Val Val Ala Ala Ala Val Leu Pro Gly
35 40 45

Phe Pro Phe Pro Ser Phe Glu Val His Asp Lys Lys Asn Pro Thr Leu
50 55 60

Glu Ile Pro Ala Gly Ala Thr Val Asp Val Thr Phe Ile Asn Thr Asn
65 70 75 80

Lys Gly Phe Gly His Ser Phe Asp Ile Thr Lys Lys Gly Pro Pro Tyr
85 90 95

Ala Val Met Pro Val Ile Asp Pro Ile Val Ala Gly Thr Gly Phe Ser
100 105 110

Pro Val Pro Lys Asp Gly Lys Phe Gly Tyr Thr Asp Phe Thr Trp His
115 120 125

Pro Thr Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Val Cys Gln Ile Pro Gly His Ala
130 135 140

Ala Thr Gly Met Phe Gly Lys Ile Val Val Lys
145 150 155

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Achromabacter cycloclastes

<400> 4

Ala Asp Phe Glu Val His Met Leu Asn Lys Gly Lys Asp Gly Ala Met
1 5 10 15

Val Phe Glu Pro Ala Ser Leu Lys Val Ala Pro Gly Asp Thr Val Thr
20 25 30

Phe Ile Pro Thr Asp Lys Gly His Asn Val Glu Thr Ile Lys Gly Met
35 40 45

Ile Pro Asp Gly Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Ile Asn Glu Asn Tyr
50 55 60

PCT/US05/35758

Lys Val Thr Phe Thr Ala Pro Gly Val Tyr Gly Val Lys Cys Thr Pro
65 70 75 80

His Tyr Gly Met Gly Met Val Gly Val Val Gln Val Gly Asp Ala Pro
85 90 95

Ala Asn Leu Glu Ala Val Lys Gly Ala Lys Asn Pro Lys Lys Ala Gln
100 105 110

Glu Arg Leu Asp Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Asn
115 120

<210> 5
<211> 93
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser
1 5 10 15

Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser Gly
20 25 30

Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val Ile Ala His
35 40 45

Thr Lys Leu Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr Phe Asp Val
50 55 60

Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys Thr Phe Pro
65 70 75 80

Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Thr Leu Lys
85 90

<210> 6
<211> 54
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser
1 5 10 15

PCT/US05/35758

Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser Gly
20 25 30

Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val Ile Ala His
35 40 45

Thr Lys Leu Ile Gly Ser
50

<210> 7
<211> 42
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 7

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser
1 5 10 15

Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser Gly
20 25 30

Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
35 40

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 8

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu
1 5 10 15

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 9

Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala
1 5 10 15

Ser Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
20 25

84

PRT/US05/35758

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 10

Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala
1 5 10 15

Ser

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 11

Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
1 5 10

<210> 12
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> forward primer for pGST-azu 36-128

<400> 12
cgggatcccc ggcaacctgc cgaagaacgt catgggc 37

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for pGST-azu 36-128

<400> 13
cggaattcgc atcacttcag ggtcaggg 28

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

PCT/US05/35758

<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 36-50

<400> 14

ggccacaact gggactgtg aaccgccgcc gacatgcag

39

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 36-50

<400> 15

ctgcatgtcg gggcggttc acagtaccca gttgtggcc

39

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 36-77

<400> 16

cctgsagccc gacgactgac gtgtcatcgc ccacacc

37

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 36-77

<400> 17

ggtgtgggag atgacacgtc agtcgtcggg cttcagg

37

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 36-89

<400> 18

ccaagctgat cggctcgtga gagaaggact cggtgacc

38

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

PCT/US05/35758

<213> Artificial sequence

<220>

<223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 36-89

<400> 19

ggtcaccgag tccttctctc acgagccgat cagcttgg

38

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward primer for pGST-azu 50-77

<400> 20

cgggatcctg agcaccgccg ccgacatgca ggg

33

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward primer for pGST-azu 67-77

<400> 21

cgggatcccc ggcctggaca aggattacct gaagcccg

38

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for pGST-azu 50-77 and pGST-azu 67-77

<400> 22

cgggaattcgc atcacttcag ggtcaggg

28

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 50-66

<400> 23

gacggcatgg cttcctgact ggacaaggat tacc

34

PCT/US05/35758

<210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 50-66

<400> 24
 ggtaatcctt gtccagtcag gaagccatgc cgtc 34

<210> 25
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> forward primer for green fluorescence protein gene

<400> 25
 cgggatcccc atggtgagca agggcg 26

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse primer for green fluorescence protein gene

<400> 26
 cgggaattcct tgtacagctc gtccatgccg 30

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> forward primer for gst-gfp-azu 50-77

<400> 27
 ccgctcgagc ctgagcacccg ccgccatgca ggg 33

<210> 28
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse primer for gst-gfp-azu 50-77

<400> 28

PCT/US05/35758

ttttcctttt gcggccgctc agtcgtcggg cttcaggtaa tcc

43

<210> 29
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae*

<400> 29

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

Ser Thr Asp Gln Met Met Tyr Asp Thr Lys Ala Ile Gln Ile Asp Lys
 20 25 30

Ser Cys Lys Glu Phe Thr Leu Asn Leu Thr His Ser Gly Ser Leu Pro
 35 40 45

Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser Lys Lys Ala Asp Ala
 50 55 60

Ser Ala Ile Thr Thr Asp Gly Met Ser Val Gly Ile Asp Lys Asp Tyr
 65 70 75 80

Val Lys Pro Asp Asp Thr Arg Val Ile Ala His Thr Lys Ile Ile Gly
 85 90 95

Ala Gly Glu Asn Asp Ser Val Thr Phe Asp Val Ser Lys Leu Asp Pro
 100 105 110

Ala Glu Asp Tyr Gln Phe Phe Cys Thr Phe Pro Gly His Ile Ser Met
 115 120 125

Met Lys Gly Ala Val Thr Leu Lys
 130 135

<210> 30
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 30

Met Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Ile Ser Ala Ala Val Ile Gly Leu Ala
 1 5 10 15

PCT/US05/35758

Ala Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala
20 25 30

Ala Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala
35 40 45

Asp Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu
50 55 60

Ser Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys
65 70 75 80

Ala Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro
85 90 95

Lys Thr Ser Met Gly His Asn Ile Val Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met
100 105 110

Asp Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val
115 120 125

Lys Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly
130 135 140

Gly Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly
145 150 155 160

Glu Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn
165 170 175

Gly Lys Val Thr Leu Val Asp
180

<210> 31
<211> 150
<212> PRT
<213> *Vibrio parahaemolyticus*

<400> 31

Met Ser Leu Arg Ile Leu Ala Ala Thr Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

Phe Gly Ala Gln Ala Ser Ala Glu Cys Glu Val Ser Ile Asp Ala Asn
20 25 30

PCT/US05/35758

Asp Met Met Gln Phe Ser Thr Lys Thr Leu Ser Val Pro Ala Thr Cys
35 40 45

Lys Glu Val Thr Leu Thr Leu Asn His Thr Gly Lys Met Pro Ala Gln
50 55 60

Ser Met Gly His Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala
65 70 75 80

Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys
85 90 95

Pro Asp Asp Glu Arg Val Tyr Ala His Thr Lys Val Val Gly Gly Gly
100 105 110

Glu Ser Thr Ser Ile Thr Phe Ser Thr Glu Lys Met Thr Ala Gly Gly
115 120 125

Asp Tyr Ser Phe Phe Cys Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Ile Met Gln
130 135 140

Gly Lys Phe Glu Phe Lys
145 150

<210> 32
<211> 129
<212> PRT
<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 32

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Ala Gly Thr Asp Gln Met Gln Phe Asp
1 5 10 15

Lys Lys Ala Ile Glu Val Ser Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Arg Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile
50 55 60

PCT/US05/35758

Ala Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Leu Ala His Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ala Lys Leu Ala Ala Gly Asp Asp Tyr Thr Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Val
115 120 125

Asp

<210> 33
<211> 162
<212> PRT
<213> Chloroflexus aurantiacus

<400> 33

Met Lys Ile Thr Leu Arg Met Met Val Leu Ala Val Leu Thr Ala Met
1 5 10 15

Ala Met Val Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser
20 25 30

Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Val Thr Ile Glu Ile Gly Ser
35 40 45

Lys Gly Glu Glu Leu Ala Phe Asp Lys Thr Glu Leu Thr Val Ser Ala
50 55 60

Gly Gln Thr Val Thr Ile Arg Phe Lys Asn Asn Ser Ala Val Gln Gln
65 70 75 80

His Asn Trp Ile Leu Val Lys Gly Gly Glu Ala Glu Ala Ala Asn Ile
85 90 95

Ala Asn Ala Gly Leu Ser Ala Gly Pro Ala Ala Asn Tyr Leu Pro Ala
100 105 110

Asp Lys Ser Asn Ile Ile Ala Glu Ser Pro Leu Ala Asn Gly Asn Glu
115 120 125

PCT/US05/35758

Thr Val Glu Val Thr Phe Thr Ala Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Leu Tyr
130 135 140

Ile Cys Thr Val Pro Gly His Tyr Pro Leu Met Gln Gly Lys Leu Val
145 150 155 160

Val Asn

- <210> 34
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Chloroflexus aurantiacus
- <400> 34

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

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

Thr Ser Leu Ser Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Arg Leu Asp Phe Val
35 40 45

Asn Gln Asn Asn Leu Gly Val Gln His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly
50 55 60

Gly Asp Asp Val Ala Ala Ala Val Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala
65 70 75 80

Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro Asp Thr Pro Asn Ala Leu Ala Trp
85 90 95

Thr Ala Met Leu Asn Ala Gly Glu Ser Gly Ser Val Thr Phe Arg Thr
100 105 110

Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Tyr Ile Cys Thr Phe Pro Gly His Tyr
115 120 125

Leu Ala Gly Met Lys Gly Thr Leu Thr Val Thr Pro
130 135 140

PCT/US05/35758

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> conserved sequence of cupredoxin entry domain

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Asp
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 36

Met Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Ile Ser Ala Ala Val Ile Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala
 20 25 30

Gly Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala
 35 40 45

Asp Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu
 50 55 60

PCT/US05/35758

Ser Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys
65 70 75 80

Ala Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro
85 90 95

Lys Ala Ser Met Gly His Asn Leu Val Ile Ala Lys Ala Glu Asp Met
100 105 110

Asp Gly Val Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val
115 120 125

Lys Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly
130 135 140

Gly Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly
145 150 155 160

Asp Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn
165 170 175

Gly Lys Val Thr Leu Val Asp
180

<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 37

Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 38
<211> 33
<212> PRT
<213> *Chloroflexus aurantiacus*

<400> 38

His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly Gly Asp Asp Val Ala Ala Val
1 5 10 15

PCT/US05/35758

Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro
 20 25 30

Asp

<210> 39
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Bordetella pertussis

<400> 39

Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp
 20 25

<210> 40
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Nesseria meningtitidis

<400> 40

Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met Asp Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys Pro Asp Asp
 20 25

<210> 41
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 41

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

Leu Asp Lys Asp Tyr
 20

<210> 42
 <211> 15

PCT/US05/35758

<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 42

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

<210> 43
<211> 129
<212> PRT
<213> Bordetella pertussis

<400> 43

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Ala Gly Thr Asp Gln Met Gln Phe Asp
1 5 10 15

Lys Lys Ala Ile Glu Val Ser Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Arg Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile
50 55 60

Ala Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Leu Ala His Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ala Lys Leu Ala Ala Gly Asp Asp Tyr Thr Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Val
115 120 125

Asp

<210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

PCT/US05/35758

<400> 44

Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser
1 5 10 15

Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 45

<211> 27

<212> PRT

<213> Pseudomonas syringae

<400> 45

Ser Lys Lys Ala Asp Ala Ser Ala Ile Thr Thr Asp Gly Met Ser Val
1 5 10 15

Gly Ile Asp Lys Asp Tyr Val Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 46

<211> 27

<212> PRT

<213> Vibrio parahaemolyticus

<400> 46

Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala
1 5 10 15

Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 47

<211> 27

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 47

Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile Ala Ala
1 5 10 15

Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp
20 25

<210> 48

<211> 15

PCT/US05/35758

<212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> conserved sequence of cupredoxin entry domain

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(6)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 48

Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Asp
 1 5 10 15

AGENTES DE TRANSPORTE DERIVADOS DE CUPREDOXINAS Y MÉTODOS DE UTILIZAR LOS MISMOS.

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud patente provisional norteamericana número 60/616,782, presentada el 7 de octubre de 2004, de la solicitud patente provisional norteamericana número 60/680,500, presentada el 13 de mayo de 2005, y de la solicitud patente provisional norteamericana número 60/700,297, presentada el 19 de julio de 2005. El contenido íntegro de estas solicitudes es incorporado completamente aquí como referencia.

10 DECLARACIÓN DE INTERÉS GUBERNAMENTAL

El contenido de esta solicitud ha sido apoyado por una concesión de una investigación de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Bethesda, Maryland, de los Estados Unidos de América (Número de Concesión ES 04050-18). El gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

15 ANTECEDENTES

La entrada de una proteína en una célula de mamífero es frecuentemente dictada por un segmento pequeño de la proteína, que se refiere comúnmente como un "dominio de la transducción de la proteína" o PTD. Este segmento se puede utilizar como una señal unida a una proteína foránea para facilitar transporte de tal proteína en una célula de mamífero. Por ejemplo, los péptidos anfipáticos se utilizan para facilitar la incorporación de metaloporfirinas cortadoras de ADN como fármacos antitumorales potenciales en los fibroblastos humanos HS68 o en las células L1210 de leucemia linfocítica murina (Chaloin, L. et al. Bioconjugate Chem. 12:691 - 700, (2001)). Los péptidos, llamados péptidos penetrantes de la célula, tales como penetratin, transportan, Tat (aminoácidos 47-57 ó 48-60) y el péptido anfipático modelo MAP, se han utilizado como vehículos de entrega para transportar sustancias farmacológicamente importantes, tales como oligonucleótidos antisentido, proteínas y péptidos (Hallbrink, M. et al. Biochem. Biophys. Acta 1515:101 - 109 (2001); Lindgren, M., et al. Trends Pharmacol. Sci. 21:99 - 103 (2000)).

30 Tales péptidos, particularmente el homeodominio de unión al ADN de *Antennapedia*, un factor de la transcripción de *Drosophila*, o el péptido portador de 21 residuos Pep-1, son internalizados por muchos tipos de células en cultivo, tal como las HS68

humanas o los fibroblastos NIH-3T3 murinos, a 37 °C ó a 4°C. La falta del efecto del cambio de temperatura sugiere un mecanismo de penetración diferente al de la endocitosis clásica (Morris, M.C. et al. Nature Biotechnol. 19:1173 - 1176 (2001)), que requiere de las proteínas del receptor quiral. Uno de los péptidos más
5 ampliamente utilizados para transportar compuestos farmacológicamente activos en células de mamíferos es el dominio de la transducción de la proteína rica en arginina de once aminoácidos (PTD) de la proteína transactivadora Tat del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-I) (Schwarze, S.R. et al. Science 285:1569 - 1572 (1999), Schwarze, S.R. et al. Trends Cell. Biol. 10:290 - 295 (2000)). La
10 inyección intraperitoneal de la proteína de fusión beta galactosidasa/Tat de 120 kDa resulta en la transducción transcelular de la proteína de fusión en virtualmente todos los tejidos en ratones, incluyendo el paso a través de la barrera hemato-encefálica. Este péptido corto del dominio de la Tat del VIH-I se ha demostrado que media la internalización celular de grandes moléculas o partículas, incluyendo nanopartículas
15 magnéticas, vectores fagos, liposomas y plámidos de ADN. A diferencia de otros péptidos penetrantes de la célula discutidos arriba, la internalización de las proteínas transportadoras o "carga" por la Tat de longitud completa o por su dominio de la transducción de 11 aminoácidos, se deteriora significativamente a 4 °C (Liu, Y. et al. Nat. Med. 6:1380 - 1387 (2000), Suzuki, T. et al. J. Biol. Chem. 277:2437 - 2443
20 (2002)) y requiere de interacciones con receptores tales como las cadenas de sulfato de heparan de la membrana celular de los proteoglicanos de sulfato de heparan.

La mayor parte de los PTDs identificados hasta la fecha se ha derivado de fuentes virales y de mamíferas. Otras fuentes de PTDs serían deseables para el diseño de varias secuencias experimentales, y para las terapias de animales y humanas y para
25 procedimientos profilácticos. Una fuente alternativa de PTDs son las células bacterianas. Aunque o las proteínas bacterianas tales como la toxina del cólera se conoce que entran en el citosol de la células de mamíferos (Sofer, A. y Futerman, A.H.J. Biol Chem. 270:12117 - 12122 (1995)), la citotoxicidad de tales proteínas ha limitado el uso de las proteínas bacterianas, o de los PTDs derivados de ellas, para
30 transportar cargas o compuestos farmacológicamente importantes en las células de mamíferos.

RESUMEN INVENCION

Un aspecto de la presente invención es un péptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos para

cuando menos una cupredoxina tipo salvaje (wt) de longitud completa o para la proteína de la membrana externa H.8, y el cual facilita la entrada de una molécula transportadora enlazada a él en una célula de cáncer de mamífero. En algunas materializaciones, el péptido al menos aproximadamente un 90% de identidad en la

5 secuencia de aminoácidos que una azurina, una plastocianina, una rusticianina, una pseudoazurina, una auracianina o una proteína similar a la azurina de longitud completa, o para la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 1, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 2, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 3, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 4, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 29, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 30,

10 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 31, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 32, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 33, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 34, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 36 e IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43. En algunas materializaciones, el péptido se deriva de *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*,

15 *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Chloroflexus aurantiacus* y *Neisseria gonorrhoeae*. En otras materializaciones, el péptido es al menos de 10 residuos y no más que 50 residuos de longitud. En algunas materializaciones, el péptido comprende una secuencia que tiene al menos identidad en la secuencia de

20 aminoácidos de aproximadamente el 90% con la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 37, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41,

25 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47 o IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47. En otras materializaciones, el péptido comprende o consiste en la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7,

30 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 37, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46,

35 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47 o IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47. En

algunas materializaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos DGXXXXDXXYXKXXD y DGXXXXDXXYXKXXD, donde D es ácido aspártico, G es glicina, Y es tirosina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. Finalmente, en algunas materializaciones, el péptido tiene homología estructural significativa para los 50-77 aminoácidos de la región de la azurina de *Pseudomonas aeruginosa*.

Otro aspecto de la invención es un complejo que comprende un compuesto transportador y una secuencia de aminoácidos, donde la secuencia de aminoácidos tiene al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 90% con una cupredoxina o un fragmento de la misma, la secuencia de aminoácidos, o el fragmentos de ésta, se liga o enlaza al compuesto transportador, y la secuencia de aminoácidos facilita la entrada del compuesto transportador en una célula de cáncer de mamífero. En algunas materializaciones, la secuencia de aminoácidos de este complejo tiene al menos identidad en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 90% cuando menos para una cupredoxina tipo salvaje de longitud completa o la proteína de la membrana externa H.8. En otras materializaciones, el compuesto transportador es una proteína, una lipoproteína, un polipéptido, un péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, un pigmento, una micropartícula, una nanopartícula, una toxina y un fármaco. En materializaciones particulares, la carga es una proteína o un polipéptido el cual está enlazado a una secuencia de aminoácidos para formar una proteína de fusión. En otras materializaciones particulares, el compuesto transportador es una toxina, más particularmente, la exotoxina A. de *Pseudomonas aeruginosa*. En otras materializaciones, la carga es una sustancia detectable, más específicamente una sustancia detectable por fluorimetría, microscopía, Rayos X CT, MRI o ultrasonido. Finalmente, la invención también comprende el complejo en un portador farmacéuticamente apropiado.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a un método para entregar un compuesto transportador en una célula. En una materialización, este método comprende poner en contacto una célula o las células con el complejo anteriormente mencionado. En otras materializaciones, la célula o las células se originan de un paciente que sufre de cáncer, y se reintroducen en el paciente. En otras materializaciones, la célula es una célula de cáncer, más específicamente una célula de osteosarcoma, una célula de carcinoma de pulmón, una célula de carcinoma de colon, una célula de linfoma, una célula de leucemia, una célula sarcoma de tejido

blando, una célula de carcinoma de seno, una célula de carcinoma de hígado, célula de carcinoma de vejiga o una célula de carcinoma de próstata. En otras materializaciones, el complejo se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. En otras materializaciones, el complejo se administra por
5 vía intravenosa, tópica, subcutánea, intramuscular o en un tumor. En otras materializaciones, el complejo se co-administra con otro tratamiento para el cáncer.

Otro aspecto de la invención es un método para diagnosticar cáncer. En algunas materializaciones, el complejo con una carga que es una sustancia detectable, se administra a un paciente con cáncer y se detecta la localización de la carga. En
10 materializaciones particulares, el compuesto transportador es un agente de contraste por rayos X y son detectadas por Rayos X CT, el compuesto transportador es un agente de contraste de para imagen por resonancia magnética y es detectado por MRI, y el agente de carga es un agente de contraste para ultrasonido y es detectable por ultrasonido. En otras materializaciones, la célula o las células se ponen en
15 contacto con un complejo con una sustancia detectable y la localización de la carga se detecta.

Otro aspecto de la invención es un conjunto que contiene uno de los anteriores complejos. En algunas materializaciones, el conjunto además comprende un adyuvante o un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otras materializaciones,
20 el conjunto adicionalmente comprende un vehículo para la administración del reactivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS:

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 1 es la secuencia de aminoácidos de la azurina tipo
25 salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 2 es la secuencia de aminoácidos de la plastocianina de *Phormidium laminosum*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 3 es la secuencia de aminoácidos de la rusticianina de los *Thiobacillus ferrooxidans*.

30 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 4 es la secuencia de aminoácidos de la pseudoazurina de *Achromobacter cycloclastes*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 36-128 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 36-89 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 5 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 36-77 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 8 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 36-50 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 10 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 50-77 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 10 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 50-66 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 11 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de aminoácidos azu 67-77 de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 15 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 12 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 36-128.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 13 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el pGST-azu 36-128.

- 20 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 14 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 36-50.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 15 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el pGST-azu 36-50.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 16 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 36-77.

- 25 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 17 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el pGST-azu 36-77.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 18 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 36-89.

- 30 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 19 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el pGST-azu 36-89.

- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 20 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 50-77.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 21 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 67-77.
- 5 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 22 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el pGST-azu 50-77 y el pGST-azu 67-77.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 23 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el pGST-azu 50-66.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 24 es la secuencia de aminoácidos del cebador
10 inverso para el pGST-azu 50-66.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 25 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el gen de la proteína fluorescente verde.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 26 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el gen de la proteína fluorescente verde.
- 15 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 27 es la secuencia de aminoácidos del cebador delantero para el gst-gfp-azu 50-77.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 28 es la secuencia de aminoácidos del cebador inverso para el gst-gfp-azu 50-77.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 29 es la secuencia de aminoácidos de la azurina de
20 *Pseudomonas syringae*.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 30 es la secuencia de aminoácidos de la azurina/ proteína H.8 de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 31 es la secuencia de aminoácidos de la azurina del *Vibrio parahaemolyticus*.
- 25 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 32 es la secuencia de aminoácidos de la azurina de *Bordetella bronchiseptica*.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 33 es la secuencia de aminoácidos de la auracianina A de *Chloroflexus aurantiacus*.
- IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 34 es la secuencia de aminoácidos de la
30 auracianina B de *Chloroflexus aurantiacus*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 35 es una secuencia de aminoácidos artificial que representa los residuos conservados en el dominio de entrada de la cupredoxina donde D es ácido aspártico, G es glicina, Y es tirosina, K es lisina y X es cualquier aminoácido.

- 5 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 36 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Laz de *Neisseria gonorrhoeae*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 37 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 50-67 aminoácidos de la azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 10 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 57-89 aminoácidos de la auracianina B de *Chloroflexus aurantiacus*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 50-77 aminoácidos de la azurina de *Bordetella pertussis*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 106-132 aminoácidos de la proteína Laz de *Neisseria meningitidis*.

- 15 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 53-70 aminoácidos de la azurina de *P. aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de aminoácidos 53-64 de la azurina de *P. aeruginosa*.

- 20 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43 es la secuencia de aminoácidos de la azurina de *bordetella pertussis*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 51-77 aminoácidos de la azurina de *P. aeruginosa*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 45 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 51-77 aminoácidos de la azurina de *Pseudomonas syringae*.

- 25 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 52-78 aminoácidos de la azurina de *Vibrio parahaemolyticus*.

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47 es la secuencia de aminoácidos del fragmento de 51-77 aminoácidos de la azurina de *Bordetella bronchiseptica*.

- 30 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 48 es una secuencia de aminoácidos artificial que representa los residuos conservados en el dominio de entrada de la cupredoxina

donde D es ácido aspártico, G es glicina, Y es tirosina, K es lisina y X es cualquier aminoácido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1 (a) y (b). Gráficos que muestran que la entrada de la azurina se correlaciona con la citotoxicidad, (a) Ensayos de MTT fueron realizados para la determinación de la citotoxicidad inducida azurina tipo salvaje contra J774, en células UISOMel-2 y fibroblastos, (b) análisis de la progresión del ciclo celular en células normales humanas de fibroblastos tratadas con la azurina mutante M44KM64E. Las células de fibroblastos fueron incubadas con 0 (control), 0.5 ó 1.0 mg/ml de la azurina mutante por 24 horas. Al final del tratamiento, el contenido del ADN en las células fue determinado por citometría de flujo.

Figura 2 (a) y (b). (a) Representación esquemática de varias construcciones de azurina truncada y sus perfiles de purificación. Varios fragmentos del gen azu fueron fusionados en el extremo 3' del gen gst en marco, (b) proteínas de fusión GST-azu fueron purificadas después del crecimiento y de la lisis celular, cargadas en SDS-PAGE y visualizadas por tinción con Azul de Coomassie.

Figura 3 (a), (b) y (c). (a) Diagrama que muestra la construcción de una proteína de fusión GST-GFP-azu 50-77. El gen gfp fue introducido en el extremo 3' del gen gst (para GST-GFP) y el fragmento azu 50-77 entonces fue ligado en el extremo 3' del gen gfp en marco para producir la proteína de fusión GST-GFP-azu 50-77. GST-GFP-azu 50-77 fue purificada como sola proteína de fusión a partir de los lisados celulares. Las proteínas purificadas fueron corridas en SDS-PAGE y detectadas por tinción de Azul de Coomassie (9 (b)) y también por Western blotting usando un anticuerpo anti-azurina (9 (c)).

Figura 4 (a), (b) y (c). Diagramas que muestran un estudio cinético para la internalización de las proteínas de fusión GST-Proteína fluorescente verde (GFP) y GST-GFP-azurina. La fluorescencia verde fue ensayada en células J774 tratadas con varias concentraciones de GST-GFP (10 (a)) o GST-GFP-azu 50-77 (10 (b)) 37 °C por 1 hora. Diez mil células fueron analizadas por citometría de flujo, (c) Dependencia de la internalización de GST-GFP-azu 50-77. Las células J774 fueron incubadas con 200 µg/ml de GST-GFP-azu 50-77 por tiempos indicadas a 37°C y analizadas por citometría de flujo.

Figura 5 (a), (b) y (c). (a) Diagrama que muestra el dominio III de la exotoxina A (aminoácidos 405-613), así como parte del dominio 1b (aminoácidos 381-404), se fusionó a GST (GST-PEDIII) según lo descrito anteriormente para la fusión de GST-GFP. El fragmento azu 50-77 entonces fue ligado al extremo carboxilo de GST-PEDIII (GST-PEDIII-azu 50-77), usando PCR. (b) Las proteínas de fusión fueron purificadas por gel filtración en una columna cromatográfica de glutatión Sefarosa 4B y corridas sobre SDS-PAGE para la determinación del tamaño, (c) diagrama que muestra la acción de la proteína de fusión GST-PEDIII-azu 50-77 en células de cáncer UIISO-Mel-2 y en células normales de fibroblastos (FBT), según lo determinado por citotoxicidad mediada por PEDIII. Varias concentraciones, según lo indicado, de GST-PEDIII y GST-PEDIII-azu 50-77 fueron incubadas con células UIISO-Mel-2 y FBT por 24 h, después de lo cual la viabilidad celular fue determinada por ensayo de MTT.

Figura 6. Diagrama que muestra la localización de la α -hélice en la azurina tipo salvaje así como en el dominio de la transducción de la proteína 50-77 de la azurina tipo salvaje. Se indica el reemplazo de tres aminoácidos en el dominio de la azurina 50-77 por residuos prolina.

Figura 7. Diagrama de la citotoxicidad mediada por PEDIII de la proteína de fusión GST-PEDIII-rusticianina contra células de cáncer UIISO-Mel-2 y células FBT. Varias concentraciones, según lo indicado, de GST-PEDIII y de GST-PEDIII-azu 50-77 fueron incubadas con las células UIISO-Mel-2 y FBT por 24 h, después de lo cual se determinó la viabilidad celular por análisis de MTT.

Figura 8 (a) y (b). (a) Diagrama que muestra la alineación estructural de la azurina con otras cupredoxinas, según lo computado por el algoritmo VAST. Las partes extendidas del N-terminal de la auracianina B y la rusticianina, que están ausentes en la azurina, se han omitido en la figura. Las barras negras indican las regiones de la azurina que se pueden sobreponer sobre los residuos de cada vecino. Los espacios en blanco son regiones sin alinear. El dominio de la transducción de la proteína azurina (PTD), aminoácidos 50-77 de la azurina, donde no hay alineación con la rusticianina es destacado por las líneas discontinuas verticales. Los números entre paréntesis después de los nombres de las cupredoxinas son los números de acceso de la proteína en la base datos (b). Alineación múltiple de las secuencias de aminoácidos de los residuos que comprenden la parte media en algunas azurinas bacterianas conocidas. Géneros y especies bacterianas se abrevian como sigue:

Psae, *Pseudomonas aeruginosa* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44); Pssy, *Pseudomonas syringae* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 45); Neme, *Neisseria meningitidis* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40); Vipa, *Vibrio parahaemolyticus* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46); Bobr, *Bordetella bronchiseptica* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47). Los números de aminoácidos que intervienen se dan entre paréntesis. El software CLUSTAL X (Higgins y Sharp, Gene 101:6427 - 6432 (1988)) fue utilizado para generar esta alineación múltiple de secuencias.

Figura 9. La Figura 9 representa un diagrama de la proteína Laz de *Neisseria meningitidis* y de la proteína azurina de *Pseudomonas aeruginosa*. La fraseología a la izquierda de la barra indica el nombre de la proteína. La fraseología sobre las barras indica el nombre de la región de la proteína directamente debajo en la barra. Los números debajo de la barra indican el número de aminoácidos de las regiones de unión de la proteína.

Figura 10. La Figura 10 representa las construcciones de varias proteínas de fusión de azurinas. La fraseología a la izquierda de la barra indica el nombre de la construcción, con el producto del plásmido y la proteína indicado. La fraseología sobre la barra indica la región de la proteína representada directamente debajo en la barra. "N.SP" indica el péptido señal de *Neisseria gonorrhoeae*; "H.8" indica la región H.8 de *Neisseria gonorrhoeae*; "N.Azu" indica la azurina de *Neisseria gonorrhoeae*; "P.SP" indica el péptido señal de *Pseudomonas aeruginosa*; y "P.Azu" indica el péptido señal de *P. aeruginosa*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MATERIALIZACIONES

La presente invención se relaciona con los métodos y materiales para entregar un compuesto transportador en una célula. La entrega del compuesto transportador según esta invención se logra mediante el uso de un polipéptido de transporte apropiado. En una materialización de la invención, el compuesto transportador se enlaza al polipéptido de transporte. Los péptidos de transporte apropiados incluyen una cupredoxina o un fragmento de una cupredoxina que contiene "un dominio de entrada de la cupredoxina". El término "dominio de entrada de la cupredoxina" se refiere a un fragmento de una cupredoxina que incluye la secuencia amino que se requiere para la entrada de la cupredoxina en una célula de cáncer de mamífero. Los compuestos transportadores entregados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas, lipoproteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos antisentido, pigmentos, etiquetas

fluorescentes y radiactivas, micropartículas o nanopartículas, toxinas, moléculas inorgánicas y orgánicas, moléculas pequeñas, y fármacos. En algunas materializaciones, los fármacos y las toxinas matan a las células tumorales.

En una materialización de la invención, la cupredoxina es una azurina, tal como la
 5 azurina tipo salvaje de *Pseudomonas aeruginosa*. La "azurina tipo salvaje" se refiere a la azurina tipo salvaje de *P. aeruginosa*. Similarmente, el término "dominio de entrada de la azurina tipo salvaje" se refiere a un fragmento de la azurina tipo salvaje que incluye la secuencia amino que se requiere para la entrada de la azurina tipo salvaje en una célula. En otras materializaciones de la invención, la cupredoxina es
 10 un plastocianina, un rusticianina, o un pseudoazurina, entre otras. En materializaciones específicas, la azurina es de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio parahaemolyticus* o de *Bordetella bronchiseptica*, entre otros.

En una materialización, un compuesto transportador se entrega para matar o retardar
 15 la progresión del ciclo celular en una célula, tal como una célula de cáncer. Tal célula de cáncer puede ser, por ejemplo, una célula de osteosarcoma, una célula de carcinoma de pulmón, una célula de carcinoma de colon, una célula de linfoma, una célula de leucemia, célula de sarcoma de tejido blando o célula de carcinoma de seno, de hígado, de vejiga o de próstata, entre otras. Por ejemplo, el compuesto
 20 transportador puede ser una proteína de control del ciclo celular, tal como p53; un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, tal como p16, p21 ó p27; una proteína suicida tal como la timidina quinasa o la nitroreductasa; una citoquina u otra proteína inmunomoduladora tal como la interleuquina 1, interleuquina 2 o el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); o una toxina, tal
 25 como exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras. En otras materializaciones, se entrega un fragmento biológicamente activo de una de las clases de compuestos mencionadas. En otra materialización, el compuesto transportador se entrega para generar una imagen del tejido blanco. Por ejemplo, el tejido blanco puede ser un cáncer y el compuesto transportador puede ser uno de
 30 uso general para generar una imagen para la detección por tomografía computarizada de rayos X (CT), proyección de imagen por resonancia magnética (MRI) y ultrasonido. En estas materializaciones, el compuesto transportador es un rayo gama o un positrón que emite el radioisótopo, un agente de contraste para la

proyección de imagen por resonancia magnética, un agente de contraste para rayos X, o un agente de contraste para ultrasonido.

Cupredoxinas

Las "cupredoxinas" son pequeñas proteínas azules que contienen cobre y tienen propiedades de transferencia de electrones (10-20 kDa), las cuales participan en, por ejemplo, las cadenas redox bacterianas o la fotosíntesis. El ión de cobre se une solamente por la matriz de la proteína. Un arreglo planar trigonal torcido especial para los ligandos de dos histidinas y un cisteinato alrededor del cobre, da lugar a las características electrónicas muy peculiares del sitio del metal y de un color azul intenso. Un número de cupredoxinas se han caracterizado cristalográficamente en el medio a alta resolución. Las cupredoxinas incluyen las azurinas, las plastocianinas, las rusticianinas, las pseudoazurinas, las auracianinas y las proteínas similares a azurinas. Según lo utilizado aquí, el término "cupredoxina" incluye la forma de la proteína sin el átomo de cobre presente, así como la proteína que contiene cobre.

15 Azurinas

Las azurinas son proteínas que contienen cobre de 128 residuos de aminoácidos que pertenecen a la familia de las cupredoxinas involucradas en la transferencia de electrones en las plantas y en ciertas bacterias. Las azurinas incluyen aquellas provenientes de *P. aeruginosa* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: I) ("azurina tipo salvaje"), *A. xilosoxydans*, y *A. denitrificans* (Murphy, L.M. et al, J. Mol. Biol. 315:859 - 71 (2002)). Aunque la homología de las secuencias entre las azurinas varía entre el 60-90%, la homología estructural entre estas moléculas es alta. Todas las azurinas tienen un β -sandwich con el motivo o patrón de "llave griega" y el único átomo de cobre se coloca siempre en la misma región de la proteína. Además, las azurinas poseen un parche hidrofóbico esencialmente neutro que rodea el sitio del cobre (Murphy et al.).

Plastocianinas

Las plastocianinas son las cupredoxinas que se encuentran en las plantas eucarióticas y en las cianobacterias. Contienen una molécula de cobre por molécula y son azules en su forma oxidada. Ocurren en el cloroplasto, donde funcionan como portadoras de electrones. Desde la determinación de la estructura de la plastocianina del álamo en 1978, la estructura de las plastocianinas de las algas (*Scenedesmus*, *Enteromorpha*, *Chlamydomonas*) y de las plantas (*French bean*) ha sido determinada

ya sea por métodos cristalográficos o por NMR, y la estructura de la del álamo se ha refinado a una resolución de 1.33 Å. La IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la plastocianina de la cianobacteria *Phormidium laminosum*.

- 5 A pesar de la divergencia de la secuencia entre las plastocianinas de las algas y de las plantas vasculares (Ej., identidad de secuencia del 62% entre las *Chlamydomonas* y las proteínas del álamo), las estructuras tridimensionales se conservan (Ej., desviaciones de 0.76 Å rms en las posiciones alfa C entre las proteínas de *Chlamydomonas* y del álamo). Los rasgos estructurales incluyen un sitio
- 10 de unión al cobre tetraédrico torcido en un extremo de un barril beta de ocho hebras antiparalelas, un parche negativo pronunciado, y una superficie hidrofóbica plana. El sitio del cobre se optimiza para su función de transferencia electrónica, y los parches negativos e hidrofóbicos se proponen como que están implicados en el reconocimiento de las parejas de reacción fisiológicas. La modificación química, el
- 15 entrelazamiento, y los experimentos de mutagénesis sitio-dirigida han confirmado la importancia de los parches negativos e hidrofóbicos en las interacciones de unión con el citocromo f, y han validado el modelo de las dos trayectorias funcionalmente significativas de la transferencia de electrones en las plastocianinas. Una trayectoria supuesta de la transferencia electrónica es relativamente corta (aproximadamente 4
- 20 Å) e involucra al ligando del cobre expuesto al solvente His-87 en el parche hidrofóbico, mientras que la otra trayectoria es más larga (aproximadamente 12-15 Å) e involucra al residuo casi conservado Tyr-83 en el parche negativo (Redinbo et al, J. Bioenerg. Biomembr. 26 (1): 49-66 (1994)).

Rusticianinas

- 25 Las rusticianinas son polipéptidos de simple cadena que contienen cobre azul y que se obtienen a partir de un *Thiobacillus*. La estructura cristalina por rayos X de la forma oxidada de la cupredoxina rusticianina, extremadamente estable y altamente oxidante, proveniente de *Thiobacillus ferrooxidans* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 3) ha sido determinada por la difracción anómala multi-longitud de onda y refinada a
- 30 una resolución de 1.9 Å. Las rusticianinas se componen de un plegamiento tipo sandwich beta central compuesto de dos láminas u hojas plegadas β de seis y siete hebras. Como otras cupredoxinas, el ión cobre es coordinado por un agrupamiento o cluster de cuatro residuos conservados (His 85, Cys 138, His 143, Met 148)

dispuestos en un tetraedro torcido (Walter, R.L. et al, J. Mol. Biol. 263:730 - 51 (1996)).

Auracianinas

- Tres proteínas azules de cobre pequeñas designadas como auracianina A, auracianina B-1, y la auracianina B-2 se han aislado a partir de la bacteria fotosintética verde termofílica deslizante *Chloroflexus aurantiacus*. Las dos formas B tienen características casi idénticas la una a la otra, pero son distintas de la forma A. La electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio muestra masas moleculares monoméricas aparentes como 14 (A), 18 (B-2), y 22 (B1) kDa.
- 10 La secuencia de aminoácidos de la auracianina A se ha determinado y mostró que la auracianina A es un polipéptido de 139 residuos. (Van Dreissche et al, Protein Science 8:947 - 957 (1999). His58, Cys123, His128, y Met132 se espacian de una manera esperada, si son los ligandos de los metales conservados evolutivamente como en las proteínas de cobre pequeñas conocidas, plastocianina y azurina. La
- 15 predicción de la estructura secundaria también indica que la auracianina tiene una estructura general de barril beta similar a la de la azurina de *Pseudomonas aeruginosa* y de la plastocianina de las hojas del álamo. Sin embargo, la auracianina aparece tener secuencias características de ambas clases de secuencias de las proteínas de cobre pequeñas. La semejanza total con una secuencia consenso de
- 20 azurina es aproximadamente igual que con una secuencia consenso de plastocianina, a saber 30.5%. La región 1-18 de la secuencia N-terminal de la auracianina es notablemente rica en glicina y aminoácidos que contienen grupos hidroxilo. Véase la secuencia de aminoácidos ejemplar IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 33 para la cadena A de la auracianina de *Chloroflexus aurantiacus* (No. de
- 25 Acceso NCBI. AAM12874 del NCBI Protein Data Bank).

- La molécula de auracianina B tiene un plegamiento estándar de cupredoxina. La estructura cristalina de la auracianina B de *Chloroflexus aurantiacus* ha sido estudiada (Bond et al, J. Mol. Biol. 306:47 - 67 (2001)). A excepción de una hebra N-terminal adicional, la molécula es muy similar a la de la cupredoxina bacteriana,
- 30 azurina. Como en otras cupredoxinas, uno de los ligandos del Cu se encuentra en la hebra 4 del polipéptido y las otras tres se encuentran a lo largo de un lazo grande entre las hebras 7 y 8. La geometría del sitio del Cu se discute en cuanto al espaciamiento de los aminoácidos entre los últimos tres ligandos. El dominio de unión al Cu de la auracianina B caracterizado cristalográficamente está

probablemente atado al lado periplásmico de la membrana citoplásmica por una cola del N-terminal que exhibe identidad de secuencia significativa con otras varias proteínas conocidas asociadas a membrana que transfieren electrones. Las secuencias de aminoácidos de las formas B se presentan en McManus et al. (J Biol Chem. 267:6531 - 6540 (1992).). Véase la secuencia de aminoácidos ejemplar IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 34 para la cadena A de la auracianina B de *Chloroflexus aurantiacus* (No. de Acceso 1QHQA del NCBI Protein Data Bank).

Pseudoazurinas

Los pseudoazurinas son una familia de polipéptidos de simple cadena que contienen cobre azul. La secuencia de aminoácidos de la pseudoazurina obtenida de *Achromobacter cycloclastes* se muestra en la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 4. El análisis de la estructura por rayos X de la pseudoazurina muestra que tiene una estructura similar a las azurinas aunque existe una baja homología en las secuencias entre estas proteínas. Dos diferencias principales existen entre la estructura total de los pseudoazurinas y las azurinas. Existe una extensión del carboxilo Terminal en las pseudoazurinas, con respecto a las azurinas, consistiendo en dos alfa-hélices. En la región de la mitad del péptido, las azurinas contienen un lazo extendido, acortado en los pseudoazurinas, que forma una aleta que contiene una α -hélice corta. Las únicas diferencias mayores en el sitio del átomo de cobre son la conformación de la cadena lateral MET y la longitud del enlace Met-S cobre, que es significativamente más corta en la pseudoazurina que en la azurina.

Actividad Citotóxica de las Cupredoxinas

Las cupredoxinas se han estudiado extensivamente por sus propiedades de transferencia electrónica (redox) pero hasta hace poco tiempo no se conocía que exhibían efectos citotóxicos. La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de los inventores de que las cupredoxinas, así como las proteínas de redox que contienen hierro (haem), el citocromo c551, inducen apoptosis o inhiben la progresión del ciclo celular en células tumorales de macrófagos en ratón J774 y en células de cáncer humanas. La actividad redox de las cupredoxinas no es crítica para su actividad citotóxica. Por ejemplo, las cupredoxinas sin un átomo de cobre frecuentemente exhiben una actividad redox mucho más baja comparada con aquellas que contienen el átomo de cobre, sin embargo muestran actividad citotóxica significativa. Con respecto a su actividad en células de cáncer, las cupredoxinas

inducen solamente un nivel bajo de apoptosis *in vivo* en tejidos normales de ratones tratados con cupredoxina que portan tumores.

La actividad citotóxica de las cupredoxinas se describe en la solicitud de patente co-pendiente serial número US 10/047,710, presentada el 15 de enero de 2002, y en la
5 solicitud de patente co-pendiente serial número US 10/720.603 presentada el 24 de noviembre de 2003. Estas solicitudes anteriores se incorporan aquí como referencia.

Los presentes inventores ahora muestran que el efecto selectivo de las cupredoxinas en las células de cáncer, está relacionado con la capacidad de las cupredoxinas para entrar en estas células. En el ejemplo 5, los inventores muestran que las
10 cupredoxinas entran en las células J774. Estas células son formas ascíticas del sarcoma celular del retículo murino con propiedades similares a los macrófagos. En los ejemplos 18 y 19, los inventores han mostrado que una proteína similar a la azurina, la proteína de la membrana externa H.8 de *Neisseria*, también conocida como Laz, puede específicamente penetrar las células tumorales del cerebro. En
15 comparación, las cupredoxinas muestran una extremadamente un reducido índice de entrada en las células normales.

En una materialización, la presente invención se relaciona con un "complejo" que contiene una cupredoxina o un fragmento de una cupredoxina enlazado a un "compuesto transportador" que debe ser entregado en una célula. El compuesto
20 transportador puede ser enlazado covalente o no-covalentemente para formar el complejo. Los métodos para preparar tal complejo son bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, si el compuesto transportador es una proteína o un polipéptido, el complejo se puede formar como una proteína de fusión.

Alternativamente, el compuesto transportador se puede enlazar covalentemente a la
25 cupredoxina, o al fragmento de la cupredoxina, directamente o a través de una molécula linker o enlazadora, vía, por ejemplo de un acoplamiento disulfuro o mediante un éster.

Dominio de entrada de la cupredoxina

La invención proporciona un dominio de la transducción de la proteína que permite el
30 transporte de un compuesto transportador o "carga" enlazado, en las células de cáncer de mamíferos pero no en las células no cancerosas. Se ha descubierto que las proteínas cupredoxinas comprenden un dominio de la transducción de la proteína, que es el dominio de entrada de la cupredoxina, que facilita la entrada del

transportador enlazado en las células de cáncer de mamíferos. En algunas materializaciones, la proteína entera de cupredoxina se puede utilizar para facilitar el transporte del compuesto transportador enlazado de forma selectiva en las células de cáncer. En otras materializaciones, una porción de una cupredoxina se puede utilizar para transportar el transportador enlazado en las células de cáncer. En algunas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina consiste en una región de una cupredoxina que sea menor que la longitud completa de la proteína tipo salvaje. En algunas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina consiste en más de aproximadamente 10 residuos, aproximadamente 15 residuos o aproximadamente 20 residuos de una cupredoxina. En algunas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina consiste en no más de aproximadamente 50 residuos, aproximadamente 40 residuos o aproximadamente 30 residuos de una cupredoxina. En algunas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina tiene al menos identidad en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 90%, al menos identidad en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 95% o al menos identidad en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 99% para una cupredoxina.

Según lo utilizado aquí, los términos "polipéptido," "péptido," y "proteína" se utilizan alternativamente para referir a un polímero de residuos de aminoácidos. Un "polipéptido", "péptido" o "proteína" se pueden sintetizar dentro de una célula y aislarse a partir de otras proteínas y componentes celulares. Alternativamente, un "polipéptido", "péptido" o "proteína" se pueden sintetizar artificialmente según los métodos bien conocidos en el arte, y también pueden estar libres de otras proteínas. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente. Los términos también se aplican a los polímeros naturales de aminoácidos. Los términos "polipéptido," "péptido," y "proteína" son también inclusivos de modificaciones, que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, unión a lípidos, sulfatación, gamma carboxilación de los residuos del ácido glutámico, y ribosilación ADP. Será apreciado que los polipéptidos no son siempre completamente lineares. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden ramificar como resultado de la ubiquitinación y pueden ser circulares (con o sin ramificación), generalmente como resultado de acontecimientos de post-traducción, incluyendo eventos de procesamiento natural y eventos causados por la manipulación humana que no ocurren naturalmente. Los polipéptidos circulares, ramificados y ramificados

circulares se pueden sintetizar por procesos naturales de no-traducción y también por métodos completamente sintéticos.

Los ejemplos describen un método de identificar los fragmentos de azurina tipo salvaje de *P. aeruginosa* que son apropiados para el uso en la presente invención.

- 5 Tal método también se puede utilizar para identificar los fragmentos de otras cupredoxinas. Los ejemplos 1 y 2 describen la construcción de una serie de fusiones de la glutatión S-transferasa ("GST") con la azurina tipo salvaje truncada en ambos extremos N- y C-terminal. Estos ejemplos también describen la purificación de los productos de las proteínas de fusión.
- 10 El ejemplo 9 muestra la internalización de tales fusiones en las células J774 a 37 °C. Mientras que la azurina tipo salvaje fue internalizada, la GST permaneció en la periferia de las células y no fue internalizada. Las azu 36-128 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5) y azu 36-89 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6) fueron internalizadas, al igual que la azu 36-77 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7). Truncamientos
- 15 adicionales muestran que, mientras que la azu 50-77 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9) es internalizada, la internalización de la azu 36-50 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 8) es altamente ineficiente. Otros truncamientos de la azu 50-77 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9) a la azu 50-66 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 10) y azu 67-77 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 11) demuestran muy
- 20 pequeña internalización, indicando que la internalización eficiente requiere no interferir con la secuencia en o aproximadamente las posiciones 66-67. Desde un punto de vista práctico, los datos apoyan el uso de los aminoácidos 50 a 77 para el transporte eficiente.

- En algunas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina es un dominio
- 25 de entrada de la azurina tipo salvaje. En una materialización de la presente invención, un dominio de entrada de la azurina tipo salvaje contiene al menos los aminoácidos 50 a 77 de la azurina tipo salvaje (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la azurina tipo salvaje contiene al menos los aminoácidos 36 a 77 de la azurina tipo salvaje
- 30 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la azurina tipo salvaje contiene al menos los aminoácidos 36 a 89 de la azurina tipo salvaje (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la azurina tipo salvaje contiene al menos los aminoácidos 36 a 128 de la azurina tipo salvaje

(IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5). En aún otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la azurina tipo salvaje contiene al menos los aminoácidos 50 a 67 de la azurina tipo salvaje (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 37). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la azurina tipo salvaje
5 contiene al menos los aminoácidos 53 a 70 de la azurina tipo salvaje (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41). En aún otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la azurina tipo salvaje contiene al menos los aminoácidos 53 a 64 de la azurina tipo salvaje (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42).

En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina es
10 un dominio de entrada de una cupredoxina diferente de la azurina de *P. aeruginosa*. En diversas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina puede ser un fragmento de plastocianina de la cianobacteria *Phormidium laminosum* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 2), la rusticianina de *Thiobacillus ferrooxidans* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 3); la pseudoazurina de *Achromobacter*
15 *cicloclastes* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 4), la azurina de *Pseudomonas syringae* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 29), la azurina de *Neisseria meningitidis* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 30), la azurina de *Neisseria gonorrhoeae* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 36), la azurina de *Vibrio parahaemolyticus* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 31), la azurina de *Bordetella bronchiseptica*
20 (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 32), la azurina de *Bordetella pertussis* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43) o una auracianina de *Chloroflexus aurantiacus* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 33 y 34).

En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos 57 a 89 de la auracianina B de *Chloroflexus*
25 *aurantiacus* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos 50 a 77 de *Bordetella pertussis* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos 106 a 132 de *N. meningitidis* (IDENTIFICACIÓN
30 DE SEC. NO.: 40). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos 51-77 de la azurina de *Pseudomonas syringae* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 45). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos 89-115 de la proteína Laz de *Neisseria meningitidis* (IDENTIFICACIÓN DE

SEC. NO.: 40). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos 52-78 de la azurina de *Vibrio parahaemolyticus* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46). En otra materialización de la invención, el dominio de entrada de la cupredoxina contiene al menos los aminoácidos

5 51-77 de la azurina de *Bordetella bronchiseptica* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47).

Modificación de un dominio de entrada de la cupredoxina

En otra materialización de la presente invención, el dominio de entrada de una cupredoxina es químicamente modificado o genéticamente alterado para producir las variantes que conservan la capacidad de transportar un compuesto transportador en una

10 célula. Por ejemplo, el ejemplo 14 muestra que la azurina tipo salvaje que tiene residuos de prolina introducidos en las posiciones 54, 61 y 70, conserva su capacidad de entrar en las células UISO-Mel-2.

En otra materialización, el dominio de entrada de la cupredoxina comprende una secuencia conservada ((IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 35) o (IDENTIFICACIÓN DE

15 SEC. NO.: 48) donde D es ácido aspártico, G es glicina, Y es tirosina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. Ver el ejemplo 17.

Las variantes de un dominio de entrada de la cupredoxina se pueden sintetizar por técnicas estándares. Los derivados son secuencias de aminoácidos formadas a partir de los compuestos nativos, ya sea directamente o por modificación o sustitución parcial.

20 Los análogos son secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idéntica, al compuesto nativo pero difieren de él en cuanto a ciertos componentes o cadenas laterales. Los análogos se pueden sintetizar u obtener a partir de un origen evolutivo diferente.

Las variantes pueden ser de longitudes completas o diferentes de longitud completa, si

25 el derivado o el análogo contienen un aminoácido modificado. Las variantes de un dominio de entrada de cupredoxina incluyen, pero no se limitan a, las moléculas que comprenden las regiones que son sustancialmente homólogas al dominio de entrada de la cupredoxina por al menos aproximadamente el 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, ó 99% de identidad sobre una secuencia de aminoácidos de tamaño idéntico, o

30 cuando es comparada a una secuencia alineada en la cual la alineación es realizada por un algoritmo de homología.

El término de "por ciento (%)" de identidad en la secuencia de aminoácidos" entre el dominio de entrada de una cupredoxina y una secuencia candidata, se define como el

porcentaje de residuos de aminoácidos en un dominio de entrada de la cupredoxina que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia candidata cuando las dos secuencias se alinean. Para determinar el % de identidad de aminoácidos, las secuencias se alinean y en caso necesario, se introducen espacios para alcanzar el

5 máximo % de identidad de secuencias; las sustituciones conservadoras no se consideran como parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de alineación de secuencias de aminoácidos para determinar los por cientos de identidad, son bien conocidos para los de habilidad en el arte. Frecuentemente se utilizan softwares disponibles públicamente tales como los softwares PLAST, BLAST2, ALIGN2 o

10 Megalign (DNASTAR) para alinear las secuencias peptídicas.

Cuando las secuencias de aminoácidos se alinean, los % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada (la cual se puede formular alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada la cual tiene o abarca un cierto % de identidad de secuencia de

15 aminoácidos, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se pueden calcular como:

$\% \text{ de identidad de la secuencia de aminoácidos} = X/Y \cdot 100$, donde

X es el número de los residuos de aminoácidos registrados como coincidencias idénticas mediante el programa o el algoritmo de alineación de secuencias de A y B, y Y

20 es el número total de los residuos de aminoácidos en B.

Si la longitud de la secuencia de aminoácidos de A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos de B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A para B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B para A.

Se pueden introducir cambios en un dominio de entrada de la cupredoxina que incurren

25 en alteraciones en las secuencias de aminoácidos del dominio de entrada de la cupredoxina que anulan la capacidad del dominio de entrada de la cupredoxina de transportar un compuesto transportador en una célula. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar en la secuencia del dominio de entrada de la cupredoxina sin anular su capacidad de transportar un compuesto transportador en

30 una célula, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para tal actividad.

Los aminoácidos para los cuales las sustituciones "conservadoras" se pueden hacer, son bien conocidos en el arte. Las sustituciones conservadoras útiles se muestran en la

tabla 1, "Sustituciones preferidas". Sustituciones conservadoras mediante las cuales un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido de la misma clase, caen dentro del alcance de la invención, siempre y cuando la sustitución no anule la actividad del dominio de entrada de la cupredoxina. Tales intercambios que dan lugar a una

5 actividad alterada del dominio de entrada de la cupredoxina se contemplan como parte de la invención, siempre y cuando tal actividad sea apreciable.

Tabla 1: Sustituciones preferidas

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina,	Leu
Leu (L)	Norleucina, e, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

- Las sustituciones "no-conservadoras" que afectan (1) la estructura de la espina dorsal del polipéptido, tal como una conformación lámina-β o α-helicoidal, (2) la carga, (3) hidrofobicidad, o (4) el volumen de la cadena lateral del sitio blanco, pueden modificar la función del dominio de entrada de la cupredoxina. Los residuos se dividen en los grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral según lo denotado en la tabla 2. Las sustituciones no-conservadoras exigen el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.
- 10 Las sustituciones no-conservadoras mediante las cuales un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido de clase diferente caen dentro del alcance de la invención, siempre y cuando la sustitución no anule la actividad del dominio de entrada de la cupredoxina. Tales intercambios que dan lugar a la actividad alterada del dominio de la cupredoxina se contemplan como parte de la invención siempre y
- 15 cuando tal actividad es apreciable.

Tabla 2: Clases de aminoácidos:

Clase	Aminoácidos ¹
Hidrofóbicos	Norleucina no, Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrofílicos neutros	Cys, Ser, Thr
Ácidos	Asp, Glu
Básicos	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Conformación de cadena alterada	Gly, Pro
Aromáticos	Trp, Tyr, Phe

En otra materialización, las variantes de un dominio de entrada de la cupredoxina tienen una semejanza estructural significativa con los residuos 50-77 de la azurina de *P. aeruginosa*. Ejemplos de los estudios que determinan la homología estructural significativa entre las cupredoxinas y otras proteínas incluyen a Toth et al. (Developmental Cell 1: 82-92 (2001)).

Específicamente, la homología estructural significativa entre una variante del dominio de entrada de la cupredoxina y los residuos 50-77 de la azurina de *P. aeruginosa* se determina usando el algoritmo VAST (Gibrat et al, Curr Opin Struct Biol 6:377 - 385 (1996); Madej et al, Protein 23:356 - 3690 (1995)). En materializaciones específicas, el valor de p por VAST a partir de una comparación estructural de una variante del dominio de entrada de la cupredoxina y los residuos 50-77 de la azurina de *P. aeruginosa* es menor que aproximadamente 10^{-3} , menor que aproximadamente 10^{-5} , o menor que aproximadamente 10^{-7} . En otras materializaciones, la homología estructural significativa entre una variante del dominio de entrada de la cupredoxina y los residuos 50-77 de la azurina de *P. aeruginosa* se puede determinar usando el algoritmo DALI (Holm & Sandler, J. Mol. Biol. 233:123 - 138 (1993)). En materializaciones específicas, la puntuación Z mediante DALI para una comparación estructural en parejas, es al menos aproximadamente 3.5, al menos aproximadamente 7.0, o al menos aproximadamente 10.0.

Las modificaciones al dominio de entrada de la cupredoxina se pueden hacer usando métodos conocidos en el arte tal como mutagénesis (sitio-dirigida) mediada por oligonucleótidos, exploración de alaninas (alanine scanning), y mutagénesis por PCR. La mutagénesis sitio-dirigida (Carter, Biochem J. 237:1 - 7 (1986); Zoller and

Smith, Methods Enzymol. 154:329 - 50 (1987)), mutagénesis en casete, mutagénesis por selección de restricción (Wells et al, Gene 34:315 - 23 (1985)) u otras técnicas conocidas se pueden realizar sobre el ADN clonado para producir una variante de ácido nucleico del dominio de entrada de la cupredoxina. Adicionalmente, los

5 nucleótidos que codifican para los dominios de entrada con semejanza estructural a los dominios de entrada de la cupredoxina, se pueden sintetizar por métodos que son bien conocidos en el arte. Además, las moléculas de proteínas que son dominios de entrada del tipo salvaje o variantes de la cupredoxina, se pueden sintetizar por métodos que son bien conocidos en el arte.

10 **Ácidos nucleicos que codifican para el dominio de entrada de la cupredoxina y complejo de un dominio de entrada de la cupredoxina enlazado a un compuesto transportador**

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de entrada de la

15 cupredoxina enlazado a un compuesto transportador, donde el compuesto transportador es una proteína o un péptido. La molécula de ácido nucleico según la invención se puede preparar por una combinación de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, las secuencias del ácido nucleico para el dominio de entrada de la cupredoxina y el compuesto transportador se pueden preparar individualmente por

20 síntesis química o clonación. Las secuencias del ácido nucleico entonces se ligan con un ligasa en orden para dar una molécula de ácido nucleico de interés.

25 **Métodos de entregar un compuesto transportador usando un dominio de entrada de la cupredoxina**

Se conoce que muchos péptidos ricos en arginina se transfieren a través de las membranas de las células de mamíferos y trasladan compuestos transportadores proteicos dentro de tales células (Suzuki, T., et al J. Biol Chem. 277:2437 - 43 (2002)). Por ejemplo, un segmento corto rico en arginina de 11 aminoácidos

30 (aminoácidos 47-57) de la proteína Tat del VIH, permite el transporte de las proteínas transportadoras en las células de mamíferos (Schwarze, SR., et al. Trends Cell. Biol. 10:290 - 95 (2000)). Los dominios de entrada sintéticos que fortalecen el contenido alfa-helicoidal y optimizan la colocación de los residuos de arginina, se ha

demostrado que tienen potencial incrementado como dominios de la transducción de la proteína (Ho, A., et al. *Cáncer Res.* 61: 474-77 (2001)). En comparación, la azurina tipo salvaje tiene un solo residuo arginina. Por lo tanto se creía, pero no se estaba seguro hasta después de la presente invención, que su modo de entrada es
5 diferente al de la proteína Tat.

La presente invención comprende el uso de aquellos fragmentos de cupredoxina que facilitan la entrada de un compuesto transportador en una célula. Tales fragmentos se pueden determinar por cualquier método que identifique esos fragmentos requeridos para la entrada en una célula. En uno de tales métodos, un fragmento de
10 cupredoxina se enlaza a una sustancia marcadora y se ejecuta una prueba para determinar si el fragmento de cupredoxina entra a una célula. Tales métodos se pueden utilizar para identificar los fragmentos apropiados de cupredoxinas discutidos arriba.

En varias materializaciones de la presente invención, el compuesto transportador se
15 une a una cupredoxina tal como la azurina de *P. aeruginosa*. (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 1) ("azurina tipo salvaje"); la plastocianina de la cianobacteria *Phormidium laminosum* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 2); la rusticianina de *Thiobacillus ferrooxidans* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 3); o la pseudoazurina de *Achromobacter cycloclastes* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 4), las azurinas de
20 *Pseudomonas syringa* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 29), *Neisseria meningitidis* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 30), *Vibrio parahaemolyticus* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 31), *Bordetella bronchiseptica* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 32), la auracianina A y B de *Chloroflexus aurantiacus* (IDENTIFICACIÓN DE SECS. NOS.: 33 y 34) o de *Neisseria gonorrhoeae* (identificación SEQ NO 36), entre otras
25 azurinas y proteínas similares a la azurina. En otras materializaciones, el transportador se enlaza a un dominio de entrada de la cupredoxina. En varias materializaciones de la presente invención, un dominio de entrada de la cupredoxina entrega un compuesto transportador en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, la entrega se puede alcanzar *in vitro* mediante la adición un complejo de un
30 dominio de entrada de la cupredoxina y un compuesto transportador a un cultivo celular, tal como un frotis o citología vaginal (pap smear). Alternativamente, la entrega puede se alcanzar *ex vivo* agregando el complejo a una muestra extraída de un paciente, por ejemplo, de la sangre, de un tejido, o de la médula, y retornar la muestra tratada al paciente. La entrega se puede también lograr mediante la

administración del complejo directamente a un paciente. Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para propósitos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de investigación. Los compuestos transportadores entregados mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las proteínas, lipoproteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleico antisentido, pigmentos, micropartículas o nanopartículas, toxinas, moléculas orgánicas e inorgánicas, moléculas pequeñas, y fármacos.

En una materialización, una sustancia detectable, por ejemplo, una sustancia fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde; una sustancia luminiscente; una enzima, tal como la β -galactosidasa; o una proteína radiactiva o biotinilada, se entrega para conferir un fenotipo detectable a una célula. Similarmente, las micropartículas o nanopartículas marcadas con una sustancia detectable, por ejemplo, una sustancia fluorescente, se pueden entregar también. Un ejemplo de nanopartículas apropiadas se encuentra en la patente No. US 6,383,500 publicada el 7 de mayo de 2002, que expresamente se incorpora aquí como referencia. Muchas de tales sustancias detectables se conocen por los expertos en la materia.

En algunas materializaciones, el compuesto transportador es una sustancia detectable que es apropiada para tomografía computarizada de rayos X, proyección de imagen por resonancia magnética, proyección de imagen por ultrasonido o escintigrafía con radionucleidos. En estas materializaciones, el compuesto transportador se administra al paciente para el propósito de diagnóstico. Un agente de contraste se administra como un compuesto transportador para intensificar la imagen obtenida por Rayos X CT, MRI y ultrasonido. La administración de un compuesto transportador de radionucleido que se apunta al tejido tumoral, vía el dominio de entrada de la cupredoxina, se puede utilizar para la escintigrafía con radionucleidos. En algunas materializaciones, el dominio de entrada de la cupredoxina puede contener el radionucleótido con o sin un compuesto transportador. En otras materializaciones, el compuesto transportador es un rayo gama o un positrón que emite radioisótopos, un agente de proyección de imagen por resonancia magnética, un agente de contraste para rayos X, o un agente de contraste para ultrasonido.

Los agentes de contraste apropiados para ultrasonido para usar como compuestos transportadores incluyen, pero no se limitan a, una microburbuja de un gas biocompatible, un portador líquido, y una microesfera de tensoactivo, además

comprenden un resto enlazador opcional, L_n , entre los restos que apuntan y la microburbuja. En este contexto, el término de portador líquido significa que una solución acuosa y el término tensoactivo significa cualquier material anfifílico que produzca una reducción en la capa interfacial en una solución. Una lista de tensoactivos apropiados para formar microesferas de tensoactivo se divulgan en el documento EP 0727225A2, el cual expresamente se incorpora aquí como referencia. El término "microesfera de tensoactivo" incluye nanoesferas, liposomas, vesículas y similares. El gas biocompatible puede ser aire, o un fluorocarbono, tal como un perfluoroalcano C_3-C_5 , que proporciona la diferencia en ecogenicidad y así el contraste en la proyección de la imagen del ultrasonido. El gas se encapsula o se contiene en la microesfera a la cual se une el dominio de entrada de la cupredoxina, opcionalmente vía un grupo enlazador. La unión puede ser covalente, iónico o por fuerzas de van der Waals. Los ejemplos específicos de tales agentes de contraste incluyen perfluorocarbonos encapsulados en lípidos con una pluralidad de péptidos, polipéptidos o de peptidomiméticos que se unen a los receptores de la neovascularización tumoral.

Los agentes de contraste apropiados para rayos X para utilizarlos como compuestos transportadores incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los que absorben rayos X o átomos "pesados" de número atómico 20 o mayor, o que adicionalmente comprenden un resto enlazador opcional, L_n , entre el dominio de entrada de la cupredoxina y los átomos absorbentes de rayos X. El átomo pesado frecuentemente utilizado en agentes de contraste para rayos X es el yodo. Recientemente se han divulgado agentes de contraste para rayos X que comprenden quelatos de metales (Ej., patente No. US 5,417,959) y poliquelatos que comprenden una pluralidad de iones metálicos (Ej., patente No. US 5,679,810). Más recientemente, se han divulgado los complejos de agrupamientos multinucleares como agentes de contraste para rayos X (Ej., patente No. US 5,804,161, PCT WO91/14460, y PCT WO 92/17215).

Los agentes de contraste apropiados para MRI para el uso como compuestos transportadores incluyen, pero no se limitan a, uno o más iones de metales paramagnéticos, que comprenden adicionalmente un resto enlazador opcional, L_n , entre el dominio de entrada de la cupredoxina y los iones de metales paramagnéticos. Los iones de metales paramagnéticos están presentes bajo la forma de complejos metálicos o partículas de óxido metálico. Las patentes No. US

5,412,148 y US 5,760,191, describen ejemplos de queladores para los iones de metales paramagnéticos para ser utilizados como agentes de contraste para MRI. La patentes Nos. US 5,801,228, US 5,567,411 y US 5,281,704, describen ejemplos de poliquelantes útiles para formar complejos de más de un ión metálico paramagnético
5 con vistas a utilizarlos como agentes de contraste en MRI. La patente No US 5,520,904, describe las composiciones de partículas que comprenden iones metálicos paramagnéticos para utilizarlos como agentes de contraste en MRI.

En otra materialización, un compuesto transportador se entrega para detener o retardar la progresión del ciclo celular en una célula o matar la célula, tal como una
10 célula de cáncer. Tal célula de cáncer puede ser, por ejemplo, una célula de osteosarcoma, una célula de carcinoma de pulmón, una célula de carcinoma de colon, una célula de linfoma, una célula de leucemia, célula de sarcoma de tejido blando o célula de carcinoma de seno, de hígado, de vejiga o de próstata. Por ejemplo, el compuesto transportador puede ser una proteína de control del ciclo
15 celular, tal como p53; un inhibidor de quinasa ciclina-dependiente tales como p16, p21 o p27; una proteína de suicidio tal como la timidina quinasa o la nitroreductasa; una citoquina u otra proteína inmunomoduladora tal como la interleuquina 1, interleuquina 2 o el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); o una toxina, tal como la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. En
20 otras materializaciones, se entrega un fragmento biológicamente activo de una de las clases de compuestos antes referidas.

En otra materialización, el compuesto transportador es un ácido nucleico que codifica para una de las clases mencionadas de compuestos. En otra materialización, el compuesto transportador es un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer.
25 Tales fármacos incluyen, por ejemplo, el 5-fluorouracilo; el interferón alfa; el metotrexato; el tamoxifeno; y la vincristina. Los ejemplos anteriores se proporcionan solamente como ilustración, muchos otros de tales compuestos se conocen por los expertos en la materia.

Los compuestos apropiados para tratar el cáncer incluyen, pero no se limitan a,
30 agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, alquilsulfonatos, nitrosoureas, etileniminas, y triazenos; antimetabolitos tales como antagonistas del folato, análogos de purina, y análogos de pirimidina; antibióticos tales como antraciclinas, bleomicinas, mitomicina, dactinomicina, y plicamicina; enzimas tales como asparaginasa; inhibidores de la proteína farnesil-transferasa; inhibidores de la 5.alfa.-

- reductasa; inhibidores de la 17.beta.-hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 3; agentes hormonales tales como glucocorticoides, estrógenos/antiestrógenos, andrógenos/antiandrógenos, progestinas, antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, acetato de octreotide; agentes disruptores de los
- 5 microtúbulos, tales como las ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes estabilizantes de los microtúbulos tales como los taxanos, por ejemplo, paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™), y sus análogos, y epotilonas, tales como epotilonas A-F y sus análogos; productos derivados de las plantas, tales como alcaloides de vinca, epipodofilotoxinas, taxanos; e inhibidores de la topoisomerasa;
- 10 inhibidores de la proteína fenil-transferasa; y agentes misceláneos tales como hidroxiurea, procarbazona, mitotano, hexametilmelamina, complejos de coordinación del platino tales como cisplatino y carboplatino; y otros agentes usados como agentes anticáncer y citotóxicos tales como modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento; moduladores inmunes y anticuerpos monoclonales.
- 15 Ejemplos representativos de estas clases de agentes anticáncer y citotóxicos incluyen pero no se limitan al clorhidrato de mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, melfalán, ifosfamida, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, tiotepa, dacarbazina, metotrexato, tioguanina, mercaptopurina, fludarabina, pentastatina, cladribina, citarabina, fluorouracilo, clorhidrato de
- 20 doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, sulfato de bleomicina, mitomicina C, actinomicina D, safracinas, saframycinas, quinocarcinas, discodermolidas, vincristina, vinblastina, tartrato de vinorelbina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, paclitaxel, tamoxifeno, estramustina, fosfato de sodio de estramustina, flutamida, buserelina, leuprolida, pteridinas, diyneses, levamisol, aflacón, interferón,
- 25 interleuquinas, aldesleuquina, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoína, clorhidrato de irinotecan, betametasona, clorhidrato de gemcitabina, altretamina, y topoteca y cualesquiera análogos o derivados de los mismos.

Los miembros preferidos de estas clases incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, carminomicina, daunorubicina, aminopterina,

30 metotrexato, metopterina, mitomicina C, ecteinascidina 743, o pofiromicina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo, 6-gemcitabina, arabinósido de citosina, podofilotoxina o los derivados de la podofilotoxina tales como etopósido, fosfato de etopósido o tenipósido, melfalán, vinblastina, vincristina, leurosina, vindesina y leurosina. Ejemplos de otros agentes anticáncer y citotóxicos útiles como

compuestos transportadores incluyen los siguientes: derivados de la epotilona según lo encontrado en la patente alemana No. 4138042.8; y en las solicitudes WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 5 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253 y WO 00/00485; inhibidores de quinasa dependientes de ciclina según lo encontrado en WO 99/24416 (véase también la patente No. US 6,040,321); e inhibidores de la proteína fenil-transferasa según lo encontrado en WO 97/30992 y WO 98/54966; y agentes tales como los descritos 10 genéricamente y específicamente en la patente No US 6,011,029 (los compuestos de cuya patente se pueden emplear junto con cualquier modulador de NHR (incluyendo, pero no limitado, a aquellos de la presente invención) por ejemplo moduladores de AR, moduladores de ER, moduladores de LHRH, o con la castración quirúrgica, especialmente en el tratamiento del cáncer).

15 Los agentes terapéuticos diferentes de los anteriores, cuando se emplean como compuestos transportadores con los compuestos de la presente invención, pueden ser utilizados, por ejemplo, en las cantidades indicadas en el Physicians' Desk Reference (PDR) o según lo determinado de otra manera por uno con habilidad ordinaria en el arte.

20 **Composiciones farmacéuticas que contienen un dominio de entrada de la cupredoxina**

Las composiciones farmacéuticas que contienen un complejo de un dominio de entrada de la cupredoxina enlazado a un compuesto transportador, se pueden fabricar de cualquier manera convencional, por ejemplo, mediante procesos 25 convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, emulsificación, encapsulación, atrapamiento, o liofilización. El complejo se puede combinar fácilmente con un portador farmacéuticamente aceptable bien conocido en el arte. Tales portadores permiten a la preparación ser formulados como una tableta, píldora, gragea, cápsula, líquido, gel, jarabe, mezcla, suspensión, y similares. Los 30 excipientes apropiados pueden también incluir, por ejemplo, rellenos y preparaciones de celulosa. Otros excipientes pueden incluir, por ejemplo, sustancias aromáticas, agentes colorantes, antiadherentes, espesantes, y otros aditivos, adyuvantes, o aglutinantes aceptables.

Tales composiciones se pueden utilizar en, por ejemplo, la detección o la proyección de imagen de un tipo celular o en el tratamiento de una condición relacionada con la muerte celular o en la prevención de la misma. Las composiciones se pueden administrar en cantidad suficiente para prevenir o tratar una condición relacionada con la resistencia a la muerte celular. Según lo utilizado aquí, el término "una condición relacionada con la resistencia a la muerte celular" se refiere a una enfermedad, estado, o dolencia caracterizada por al menos una tendencia para la vida celular prolongada en comparación con una célula sana similar, según lo determinado por un médico o un clínico razonablemente experimentado.

10 Típicamente, el organismo hospedero es un mamífero, tal como un ser humano o un animal.

Administración de las composiciones que contienen un dominio de entrada de la cupredoxina

Las composiciones que contienen un dominio de entrada de la cupredoxina se pueden administrar por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por vía oral, bucal, por inhalación, sublingual, rectal, vaginal, transuretral, nasal, tópica, percutánea, es decir, transdérmica o parenteral (incluyendo administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intracoronaria). Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de los mismos se pueden administrar en cualquier cantidad eficaz para alcanzar su propósito previsto. Cuando son administrados para tratar una condición relacionada con la resistencia a la muerte celular, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. "Una cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad efectiva para prevenir el desarrollo, o aliviar los síntomas existentes, del sujeto que es tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva es en

25 conformidad con la capacidad de los expertos en la materia.

En varias materializaciones, la composición incluye portadores y excipientes (que incluyen pero no se limitan a las soluciones tamponadas o buffers, carbohidratos, manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, agentes quelantes, antioxidantes, y bacteriostáticos, agentes de suspensión, espesantes y/o

30 preservantes), agua, aceites, soluciones salinas, soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, otras sustancias auxiliares terapéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse condiciones fisiológicas, tales como neutralizantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares. Será reconocido que, mientras que se puede emplear cualquier portador apropiado conocido para los

de habilidad ordinaria en el arte con el objetivo de administrar las composiciones de esta invención, el tipo de portador variará dependiendo del modo de administración. Los compuestos se pueden también encapsular dentro de liposomas usando tecnología bien conocida. Las microesferas biodegradables se pueden también
5 emplear como portadores para las composiciones de esta invención. Microesferas biodegradables apropiados se muestran, por ejemplo, en las patentes Nos. US 4,897,268, US 5,075,109, US 5,928,647, US 5,811,128, US 5,820,883, US 5,853,763, US 5,814,344 y US 5,942,252 "Compuestos" según lo utilizado aquí, incluyen los péptidos, las secuencias de aminoácidos, los compuestos transportadores y los
10 complejos de la presente invención.

La vida media en la circulación sanguínea de las composiciones de la invención se puede extender u optimizar por varios métodos bien conocidos para aquellos con destreza en el arte, incluyendo pero no limitado a, los péptidos circularizados (Monk et al, BioDrugs 19 (4): 261-78, (2005); DeFreest et al, J. Pept. Res. 63 (5): 409-19
15 (2004)), D, L peptides (diastereomer), (Futaki et al, Biol del J. Chem. el 23 Feb; 276 (8): 5836-40 (2001); Papo et al, Cancer Res. 64 (16): 5779-86 (2004); Molineros et al, Biochem. Pharmacol. 36 (1): 169-76, (1987)); péptidos que contienen aminoácidos inusuales (Lee et al, J. Pept. Res. 63 (2): 69-84 (2004)), y modificaciones N- y C-terminales (Labrie et al, Clin. Invest. Med. 13 (5): 275-8, (1990)). De interés particular
20 son la d-isomerización (sustitución) y la modificación de la estabilidad del péptido via sustitución de D- o L-aminoácidos.

Las composiciones de la invención se pueden esterilizar por técnicas convencionales, bien conocidas de esterilización, o pueden ser esterilizadas por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para utilizar
25 como son, o liofilizar, la preparación liofilizada puede ser combinada con una solución estéril antes de la administración.

Las composiciones de la invención se pueden administrar en una variedad de maneras, incluyendo por inyección (Ej., intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal y similares), por inhalación, por administración tópica, por supositorio,
30 usando un parche transdérmico o por vía oral.

Cuando la administración es por inyección, la composición se puede formular en soluciones acuosas, preferiblemente en soluciones tamponadas fisiológicas o buffers compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o buffer salino fisiológico. La solución puede contener agentes para formular tales como agentes

suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la composición puede estar en forma de polvo para su reconstitución antes de usar, con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril libre de pirogenos.

5 Cuando la administración es por inhalación, la composición se puede entregar bajo la forma de un atomizador de aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador con el uso de un propulsor apropiado, Ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para entregar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina
10 para el uso en un inhalador o un insuflador, se pueden formular conteniendo una mezcla de las proteínas en polvo y una base apropiada de polvo tal como lactosa o almidón.

Cuando la administración por administración tópica, la composición se puede formular como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, y similares, que
15 son bien conocidos en el arte. En algunas materializaciones, la administración es por medio de un parche transdermico. Cuando la administración es por supositorio (Ej., rectal o vaginal), la composición se puede también formular en composiciones que contienen bases convencionales de supositorio.

Cuando la administración es oral, la composición se puede formular fácilmente en
20 combinación con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el arte. Un portador sólido, tal como manitol, lactosa, estearato de magnesio, y similares pueden ser empleados; tales portadores permiten a las quimiotoxinas ser formuladas como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un sujeto a ser tratado.
25 Para las formulaciones sólidas orales por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas, los excipientes apropiados incluyen rellenos tales como azúcares, de la preparaciones de celulosa, agentes granulantes, y agentes de aglutinates.

Otros portadores apropiados, bien conocidos en el arte, también incluyen portadores polivalentes, tales como un polisacárido capsular bacteriano, un dextrano o un vector
30 construido por ingeniería genética. Adicionalmente, las formulaciones de liberación sostenida que incluyen la composición, incluyen la composición que permite la liberación de la composición por períodos de tiempo prolongados, de forma tal que sin la formulación de liberación sostenida, la composición sería eliminada a partir del

sistema de un sujeto, y/o degradada, por ejemplo, por las proteasas o mediante hidrólisis simple, antes de provocar o desarrollar un efecto terapéutico.

- La formulación exacta, la ruta de administración, y la dosificación, se determina por el médico asistente, considerando la condición del paciente. La cantidad y el intervalo
- 5 de dosificación se pueden ajustar individualmente, para proporcionar los niveles del complejo en el plasma que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Generalmente, la composición deseada se administra en una mezcla con un portador farmacéutico, seleccionado con respecto a la ruta prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar.
- 10 La dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo de, por ejemplo, el compuesto que contiene el dominio de entrada de la cupredoxina empleado, el hospedero, el modo de administración y la naturaleza y severidad de las condiciones que son tratadas o diagnosticadas. Sin embargo, en una materialización de los
- 15 seres humanos se indican para ser obtenidos en dosificaciones diarias de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del compuesto que contiene el dominio de entrada de la cupredoxina. En una materialización, una dosificación diaria indicada para el tratamiento en seres humanos puede estar en el rango entre aproximadamente 0.7 mg a
- 20 aproximadamente 1400 mg de un compuesto que contiene el dominio de entrada de la cupredoxina convenientemente administrado, por ejemplo, en dosis diarias, dosis semanales, dosis mensuales, y/o mediante dosificación continua. Las dosis diarias pueden estar en dosificaciones discretas desde 1 a 12 veces por día. Alternativamente, las dosis se pueden administrar cada otro día, cada tercer día,
- 25 cada cuarto día, cada quinto día, cada sexto día, cada semana, y similamente en incrementos de días hasta 31 días. La dosificación puede ser continua, intermitente o una sola dosis, usando cualquier forma de dosificación aplicable, incluyendo tabletas, parches, administración i.v. y similares. Más específicamente, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. En materializaciones
- 30 específicas, la cantidad terapéuticamente efectiva es de aproximadamente 0.01-20 mg/kg de peso corporal. En materializaciones específicas, el nivel de dosis es de aproximadamente 10 mg/kg/día, aproximadamente 15 mg/kg/día, aproximadamente 20 mg/kg/día, aproximadamente 25 mg/kg/día, aproximadamente 30 mg/kg/día,

aproximadamente 35 mg/kg/día, aproximadamente 40 mg/kg/día, aproximadamente 45 mg/kg/día o aproximadamente 50 mg/kg/día.

El método de introducir los compuestos que contienen el dominio de entrada de la cupredoxina a los pacientes es, en algunas materializaciones, la co-administración
5 con otros fármacos conocidos para tratar el cáncer. Tales métodos son bien conocidos en el arte. En una materialización específica, los compuestos que contienen el dominio de entrada de la cupredoxina son parte de un coctel o contiene una co-dosificación de otros fármacos para tratar el cáncer. Tales fármacos incluyen, por ejemplo, los aquí enumerados y específicamente el 5-fluorouracil; el interferón
10 alfa; el metotrexato; el tamoxifeno; y la vincristina. Los ejemplos mencionados se proporcionan a modo de ilustración solamente, muchos otros de tales compuestos son conocidos para los expertos en la materia.

Otros fármacos apropiados para tratar el cáncer incluyen, pero no se limitan a, agentes tales como agentes alquilantes como las mostazas de nitrógeno,
15 alquilsulfonatos, nitrosoureas, etileniminas, y triazenos; antimetabolitos tales como antagonistas del folato, análogos de purina, y análogos de pirimidina; antibióticos tales como antraciclinas, bleomicinas, mitomicina, dactinomicina, y plicamicina; enzimas tales como asparaginasa; inhibidores de la proteína farnesil-transferasa; inhibidores de la 5.alfa.-reductasa; inhibidores de la 17.beta.-hidroxisteroide
20 dehidrogenasa tipo 3; agentes hormonales tales como glucocorticoides, estrógenos/antiestrógenos, andrógenos/antiandrógenos, progestinas, antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, acetato de octreotide; agentes disruptores del los microtúbulos, tales como las ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes estabilizantes de los microtúbulos tales como los taxanos, por
25 ejemplo, paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™), y sus análogos, y epotilonas, tales como epotilonas A-F y sus análogos; productos derivados de las plantas, tales como alcaloides de vinca, epipodofilotoxinas, taxanos; e inhibidores de la topoisomerasa; inhibidores de la proteína fenil-transferasa; y agentes misceláneos tales como hidroxiurea, procarbazina, mitotano, hexametilmelamina, complejos de
30 coordinación del platino tales como cisplatino y carboplatino; y otros agentes usados como agentes anticáncer y citotóxicos tales como modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento; moduladores inmunes y anticuerpos monoclonales. Los compuestos de la invención se pueden también utilizar conjuntamente con radioterapia y cirugía.

Ejemplos representativos de estas clases de agentes anticáncer y citotóxicos incluyen pero no se limitan al clorhidrato de mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, melfalán, ifosfamida, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, tiotepa, dacarbazina, metotrexato, tioguanina, mercaptopurina, 5 fludarabina, pentastatina, cladribina, citarabina, fluorouracilo, clorhidrato de doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, sulfato de bleomicina, mitomicina C, actinomicina D, safracinas, saframycin, quinocarcinas, discodermolidas, vincristina, vinblastina, tartrato de vinorelbina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, paclitaxel, tamoxifeno, estramustina, fosfato de sodio de estramustina, flutamida, 10 buserelina, leuprolida, pteridinas, diynes, levamisol, aflacón, interferón, interleuquinas, aldesleuquina, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoína, clorhidrato de irinotecan, betametasona, clorhidrato de gemcitabina, altretamina, y topoteca y cualesquiera análogos o derivados de los mismos.

Los miembros preferidos de estas clases incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, 15 cisplatino, carboplatino, doxorubicina, carminomicina, daunorubicina, aminopterina, metotrexato, metopterina, mitomicina C, ecteinascidina 743, o pofiromicina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo, 6-gemcitabina, arabinósido de citosina, podofilotoxina o los derivados de la podofilotoxina tales como etopósido, fosfato de etopósido o tenipósido, melfalán, vinblastina, vincristina, leurosina, vindesina y 20 leurosina. Ejemplos de otros agentes anticáncer y citotóxicos útiles como compuestos transportadores incluyen los siguientes: derivados de la epotilona según lo encontrado en la patente alemana No. 4138042.8; y en las solicitudes WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 25 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253 y WO 00/00485; inhibidores de quinasa dependientes de ciclina según lo encontrado en WO 99/24416 (véase también la patente No. US 6,040,321); e inhibidores de la proteína fenil-transferasa según lo encontrado en WO 97/30992 y WO 98/54966; y agentes tales como los descritos 30 genéricamente y específicamente en la patente No US 6,011,029 (los compuestos de cuya patente se pueden emplear junto con cualquier modulador de NHR (incluyendo, pero no limitado, a aquellos de la presente invención) por ejemplo moduladores de AR, moduladores de ER, moduladores de LHRH, o con la castración quirúrgica, especialmente en el tratamiento del cáncer).

Las composiciones farmacéuticas usadas de acuerdo con la presente invención se pueden formular de una manera convencional usando unos o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de la composición, los agentes activos, para inhibir o estimular la secreción de la composición, o una mezcla de ellos, en las preparaciones que se pueden utilizar terapéuticamente.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un dominio de entrada de la cupredoxina o una proteína de fusión que combina cualquier dominio de entrada y un compuesto transportador, se pueden insertar en vectores y utilizar como vectores en terapia génica. En terapia génica, los vectores se pueden entregar a un sujeto, mediante por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (Nabel et al, Patente No. US 5,328,470, 1994, U.S.A.), o por inyección estéril táctica (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA, vol. 91, pp 3054-57 (1994)). La preparación farmacéutica de un vector para terapia génica puede incluir un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual el vehículo de entrega del gene se impregna. Alternativamente, donde el vector de la entrega del gen completo se puede producir a partir de células recombinantes intactas, Ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir unas o más células que produzcan el sistema de entrega del gene.

En un aspecto, la composición se entrega como ADN tal como el complejo es generado *in situ*. En una materialización, el ADN está "desnudo," según lo descrito, por ejemplo, en Ulmer et al., Science 259:1745 - 49 (1993) y revisado por Cohen, Science 259 1691-92 (1993). La incorporación del ADN desnudo se puede incrementar mediante el recubrimiento del ADN sobre un portador, Ej. una perla biodegradable, que se transporta eficientemente en las células. En tales métodos, el ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de entrega conocidos para los de habilidad ordinaria en los sistemas del arte, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión bacterianos y virales.

Las técnicas para incorporar el ADN en tales sistemas de expresión son bien conocidas para los de habilidad ordinaria en el arte. Véanse por ejemplo, la patente No. US 5,736,524 y las solicitudes WO90/11092, WO93/24640, WO 93/17706.

Los vectores, usados transferir el material genético de un organismo a otro, se pueden dividir en dos clases generales: Los vectores de clonación son replicados en

plásmidos o fagos con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula hospedera apropiada y en los cuales el ADN foráneo puede ser insertada; el ADN foráneo se replica y propaga como si fuera un componente del vector. Un vector de expresión (tal como un plásmido, una levadura, o un genoma de virus animal) se utiliza para introducir el material genético foráneo en una célula hospedera o un tejido para transcribir y traducir el ADN foráneo, tal como el ADN de la composición. En los vectores de expresión, el ADN introducido se liga operablemente a elementos tales como promotores que señalan a la célula hospedera transcribir el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, por ejemplo los promotores inducibles que controlan la transcripción del gen en respuesta a factores específicos. Un polinucleótido de la composición operablemente ligado a un promotor inducible, puede controlar la expresión del polipéptido o de los fragmentos del dominio de entrada de la azurina tipo salvaje de la composición. Ejemplos de promotores inducibles clásicos incluyen aquellos que se responden al α -interferón, al shock por calor (heat shock), a los iones de metales pesados, y a los esteroides tales como los glucocorticoides (Kaufman, Methods Enzymol. 185:487 - 511 (1990)) y a la tetraciclina. Otros promotores inducible deseables incluyen los que no sean endógenos a las células en las cuales se está introduciendo la construcción, pero, sin embargo, responden en esas células cuando se provee el agente de inducción exógeno. Generalmente, los vectores de expresión útiles son frecuentemente plásmidos. Sin embargo, otras formas de vectores de expresión, por ejemplo los vectores virales (Ej., retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adeno-asociados) se contemplan.

La opción del vector se dicta por el organismo o las células que son utilizadas y el destino deseado del vector. Los vectores comprenden generalmente secuencias señales, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos reforzadores o enhancers, promotores, y secuencias de terminación de la transcripción.

Conjuntos que comprenden un complejo del dominio de entrada de la cupredoxina y un compuesto transportador

En otro aspecto, la invención proporciona conjuntos o kits que contienen uno o más de los siguientes componentes en un paquete o un envase:

(1) un reactivo que comprende un complejo de un dominio de entrada de la cupredoxina enlazado a un compuesto transportador;

(2) un reactivo que contiene un adyuvante o un excipiente terapéuticamente aceptable;

(3) un vehículo para la administración, tal como una jeringuilla;

(4) instrucciones para la administración.

- 5 Las materializaciones en las cuales dos o más de los componentes (1) - (4) se encuentran en el mismo envase también se contemplan. Cuando se provee un conjunto, los diversos componentes de la composición se pueden empaquetar en envases separados y mezclar inmediatamente antes de uso. Tal empaquetado de los componentes puede permitir el almacenamiento por separado de larga duración, sin
10 que las funciones de los componentes activos se pierdan.

Los reactivos incluidos en el conjunto se pueden proveer en envases de cualquier clase, de forma tal que la vida de los diferentes componentes sea preservada y no adsorbida ni alterada por los materiales del envase. Por ejemplo, las ampulas de cristal selladas pueden contener el polipéptido o el polinucleótido liofilizado, o los
15 buffers que se han empaquetado bajo un gas neutral, no-reaccionante, tal como el nitrógeno. Las ampules puede consistir de cualquier material apropiado, tal como cristal, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc., de cerámica, metal o cualquier otro material empleado típicamente para mantener reactivo similares. Otros ejemplos de envases apropiados incluyen botellas simples que se
20 pueden fabricar de sustancias similares como las ampulas, y sobres, que pueden comprender hojas interiores alineadas, tales como aluminio o una aleación. Otros envases incluyen tubos de ensayo, viales, frascos, botellas, jeringuillas, o similares. Los envases pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que se pueda perforar por una aguja hipodérmica de inyección. Otros
25 envases pueden tener dos compartimientos que sean separados por una membrana fácilmente desprendible, que al retiro permita que los componentes sean mezclados. Las membranas desprendibles pueden ser de cristal, plástico, caucho, etc.

Los conjuntos también pueden estar provistos de materiales de instrucción. Las instrucciones se pueden imprimir en el papel u otro sustrato, y/o se pueden proveer
30 como medio legible electrónicamente, tal como un disco blando (floppy), un CD-ROM, un DVD-ROM, un disco Zip, una videocinta, una cinta magnética para audio, un dispositivo de memoria flash, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar asociadas físicamente al conjunto; en su lugar, un usuario puede ser dirigido a un

sitio Web de Internet especificado por el fabricante o el distribuidor del conjunto, o proporcionado como un correo electrónico.

Una comprensión más completa de la presente invención se puede obtener mediante referencia a los ejemplos siguientes específicos. Los ejemplos se describen
5 solamente con el propósito de ilustrar la invención y no se conciben para limitar el alcance de la invención. Los cambios en la forma y la sustitución de equivalentes se contemplan, según las circunstancias puedan sugerir o rendir expedito. Aunque aquí se han empleado términos específicos, tales términos se conciben en un sentido
10 descriptivo y no para propósitos de limitaciones. Las modificaciones y variaciones de la invención según lo arriba dispuesto, pueden realizarse sin salir del espíritu y alcance de la misma, y, por lo tanto, sólo tales limitaciones deben ser impuestas según lo indicado por las materializaciones que se anexan.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Construcciones de plásmidos.

15 Se construyeron plásmido que expresan derivados de la fusión de la glutatión S-transferasa (GST)-azurinas tipo salvaje truncadas (azu) mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una polimerasa del DNA rectificadora de lectura. La Figura 6 muestra una representación esquemática de las varias
20 construcciones truncadas de la azurina tipo salvaje. Para el pGST-azu 36-128, un fragmento amplificado por PCR fue introducido en los sitios BamHI y EcoRI del vector de expresión de GST comercial pGEXSX (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855). El fragmento fue amplificado con pUC19-azu como molde o patrón y los cebadores, 5'- CGGGATCC CCG GCA ACC TGC CGA AGA ACG TCA TGG GC-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 12) y 5'-CGGAATTC GCA TCA CTT CAG GGT
25 CAG GG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 13), donde se subrayan los sitios BamHI y EcoRI introducidos respectivamente. El truncamiento del Carboxilo-terminal del gen *azu* fue acumulativamente realizado introduciendo un codón de parada usando el kit de mutagénesis sitio-dirigida QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA 92037).

30 Para el pGST-azu 36-50, el pGST-azu 36-77 y el pGST-azu 36-89, los codones de parada fueron introducidos en los residuos Ser51, Ser78, y Gly90, respectivamente. El plásmido que portaba el pGST-azu 36-128 fue utilizado como ADN molde o patrón. Tres conjuntos de oligonucleótidos para mutagénesis sitio-dirigida se

muestran a continuación. Para el pGST-azu 36-50: 5'-GGC CAC AAC TGG GTA CTG TGA ACC GCC GCC GAC ATG CAG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.:14), y 5'-CTG CAT GTC GGC GGC GGT TCA CAG TAC CCA GTT GTG GCC-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 15). Para el pGST-azu 36-77: 5'-CCT GAA GCC CGA CGA CTG ACG TGT CAT CGC CCA CAC C-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 16) y 5'-GGT GTG GGC GAT GAC ACG TCA GTC GTC GGG CTT CAG G-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.:17). Para el pGST-azu 36-89: 5'-CCA AGC TGA TCG GCT CGT GAG AGAAGG ACT CGG TGA CC-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 18), y 5'-GGT CAC CGA GTC CTT CTC TCA CGA GCC GAT CAG CTT GG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 19). Los plásmidos pGST-azu 50-77 y pGST-azu 67-77 fueron generados por PCR usando el pGST-azu 36-77 como ADN molde.

Los fragmentos amplificados por PCR, azu 50-77 y azu 67-77, fueron obtenidos usando las cebadores delanteros 5'-CGGGATCC TGA GCA CCG CCG CCG ACA TGC AGG G-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 20) y 5'-CGGGATCC CCG GCC TGG ACA AGG ATT ACC TGA AGC CCG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 21), donde el sitio BamHI adicionalmente introducido es indicado mediante subrayado. La cebador inverso, 5'-CGGAATTC GCA TCA CTT CAG GGT CAG GG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 22), fue utilizado en ambos casos.

El plásmido que portaba el fragmento gst-azu 50-77, fue utilizado para generar el pGST-azu 50-66 por introducción de un codón de la parada en Gly67 usando los siguientes oligonucleótidos: 5'- GAC GGC ATG GCT TCC TGA CTG GAC AAG GAT TAC C -3 ' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 23), y 5'-GGT AAT CCT TGT CCA GTC AGG AAG CCA TGC CGTC- 3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 24). El gen que codifica para la proteína fluorescente verde (gfp) también fue amplificado por PCR. Las cebadores delanteros e inversos usados fueron: 5'-CGGGATCC CCA TGG TGA GCA AGGGCG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 25) y 5'-CGGAATTC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G-3'(IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 26) que contienen los sitios de BamHI y EcoRI en el extremo 5' de cada oligonucleótido. El fragmento resultante del PCR fue ligado en el vector pGEXSX para crear el pGST-GFP. Para la preparación del plásmido de ADN que lleva gst-gfp-azu 50-77, el gen azu 50-77 fue amplificado por PCR con pGST-azu 50-77 como molde y los cebadores 5' - CCGCTCGAG CCT GAG CAC CGC CGC CATGCA GGG-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 27) y 5'-TTTTCCTTTTGCGGCCGC TCA GTC GTC GGG CTT CAG GTA ATC C-3' (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 28), donde los sitios Xho I y Not I

introducidos se subrayan respectivamente. El fragmento azu 50-77 purificado fue introducido en el pGST- GFP en los únicos sitios de las enzimas de restricción de Xho I y Not I.

Ejemplo 2 - Purificación de proteínas.

- 5 La azurina tipo salvaje y la azurina mutante M44KM64E fueron preparados y purificaron según lo descrito por Yamada, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 101, pp. 4770-75 (2004), y en la solicitud de patente co-pendiente serial número US 10/720,603, cuyos contenidos se incorporan como referencia. Brevemente, el gen de la azurina tipo salvaje fue amplificado por PCR según el método descrito por
10 Kukimoto et al., FEBS Lett, vol. 394, pp 87-90 (1996). El PCR fue realizado usando el ADN genómico de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* como ADN molde.

- El fragmento amplificado de ADN de 545 pb, digerido con HindIII y PstI, fue insertado en los sitios correspondientes de pUC19 de modo que el gen de la azurina fuera colocado corriente abajo del promotor *lac* para rendir un plásmido de expresión pUC
15 19- azuA. La cepa de *E. coli* JMI 09 fue utilizada como cepa hospedera para la expresión del gen de la azurina. La cepa recombinante de *E. coli* fue cultivada en el medio 2YT conteniendo 50 µg ml⁻¹ de ampicilina, 0.1 mM de IPTG; y 0.5 mM de CuSO₄ por 16 h a 37 °C para producir azurina. Para la preparación de la azurina mutante M44KM64E, se realizó una mutagénesis sitio-dirigida del gen de la azurina
20 usándole el kit QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA). Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciamiento del DNA.

- El plásmido de ADN pET9a, que porta el gen *rus* que codifica la cupredoxina rusticianina de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, fue obtenido del Dr. Kazuhiko Sasaki, Central Research Institute of Electric Power Industry, Chiba, Japón. La rusticianina
25 fue aislada a partir de *E. coli* BL21 (DE3) que alberga el gen *rus*, usando el método de Sasaki, K., et al. Biosci. Biotechnol. Bioquímica., vol. 67, pp. 1039-47 (2003) con algunas modificaciones. Brevemente, un buffer de ácido acético (pH 4.0) y CM-Sefarosa (Sigma Chemicals, St. Louis, MES 63178) fueron utilizados en lugar del buffer beta-alanin (pH 4.0) y la columna TSK-gel CM-650 (Tosoh Bioscience, LLC,
30 Montgomeryville, PA 18936). Otras dos cupredoxinas purificadas, la plastocianina de *Phormidium laminosum* y la pseudoazurina de *Achromobacter cycloclastes* fueron obtenidas a partir de la Dr. Beatrix G. Schlarb-Ridley, University of Cambridge, UK y el Dr. Christopher Dennison, University of Newcastle Upon Tyne, UK, respectivamente.

Todos los derivados recombinantes de la fusión GST fueron purificados como sigue:
Las células de *E. coli* BL21 fueron utilizadas como cepa hospedera. Después de la inducción con IPTG (0.4 mM) en la fase temprana del crecimiento log, en caldo L, las proteínas de fusión GST fueron purificadas a partir de los extractos celulares usando
5 cromatografía de afinidad en Glutación-Sefarosa 4B y una columna de gel-filtración de Sefadex 75 con PBS (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855). Las proteínas purificadas, la azurina tipo salvaje y los derivados GST u otras cupredoxinas, marcadas con ALEXA FLUOR® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR
97402) fueron aislados según las instrucciones del fabricante. El producto químico
10 fluorescente libre no pegado fue removido mediante una columna de gel-filtración.

Ejemplo 3 - Cultivos celulares.

Las células J774 y UISO-Mel-2 (disponibles a partir del Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, Mariland U.S.A.) fueron cultivadas según lo descrito en Yamada, T. et al., Infect. Immun. vol. 70, pp. 7054-62 (2002); Goto, M., et
15 al Mol. Microbiol., vol. 47, pp. 549-59 (2003); y Yamada, T., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 99, pp. 14098-103 (2002), cuyos contenidos se incorporan como referencia. Las células de fibroblastos normales humanas (cultivo en existencia en la colección del Department of Surgical Oncology, University of Illinois at Chicago (UIC), Chicago) fueron cultivadas en MEM con sales de Eagle, conteniendo de L-glutamina
20 2 mM, con sal, aminoácidos esenciales 0.1 mM MEM y suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, penicilina 100 Units/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Las células MCF-7 y MOF-IOF fueron cultivadas según lo descrito en Punj et al. Oncogen 23:2367 - 78 (2004).

25

Ejemplo 4 - Co-cultivo de células J774, UISO-Mel-2 y fibroblastos y microscopia confocal.

Las células J774, UISO-Mel-2, y los fibroblastos fueron cultivados en láminas individuales cubiertas. Después de la incubación durante la noche, las células fueron
30 lavadas con medios frescos y las tres líneas celulares fueron plaqueadas sobre una plato de cultivo conteniendo 200 µg/ml de azurina tipo salvaje conjugada con ALEXA FLUOR® 568. Las células entonces fueron incubadas por 0.5 k.o. 3.5 h a 37 °C bajo CO₂ al 5%.

Para la preparación de las muestras a observar al microscopio, las células fueron cultivadas en láminas durante la noche a 37 °C. Las células cultivadas fueron colocadas a 37 °C ó 4 °C por 2 h antes del tratamiento de la proteína. Los medios frescos pre-calentados a 37 °C o los medios frescos helados 4 °C fueron mezclados
5 con cupredoxinas rojo-fluorescentes (marcadas con LEXA FLUOR® 568) o los derivados de la fusión de GST, e incubados con las células. Las células fueron lavadas con PBS, y fijadas con metanol a -20 °C por 5 Min. Después del lavarse dos veces con PBS y de la adición de medios de montaje conteniendo 1.5 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción nuclear (VECTASHILD, Vector,
10 Burlingame, CA), las imágenes fueron tomados mediante un microscopio confocal.

Ejemplo 5 - Entrada de las cupredoxinas en las células J774.

La azurina tipo salvaje, su variante mutante M44KM64E, la plastocianina, la pseudoazurina y la rusticianina fueron incubadas con células J774 como en el ejemplo 4, y las células fueron examinadas usando microscopia confocal. En estos
15 experimentos, las cupredoxinas fueron conjugados con ALEXA FLUOR® 568 para despedir luz fluorescente roja e incubadas con las células J774 por 1 hora a 37 °C a una concentración de 200 µg/ml, y en experimento separado una azurina tipo salvaje y una rusticianina fueron incubadas con las células J774 por 1 hora a 37 °C a una concentración de aproximadamente 6 a 7 µM. El núcleo fue teñido de azul con DAPI.
20 Se mantuvo un control sin las proteínas. En todos los casos se observó que las cupredoxinas entraron en el citosol de las células J774. En experimentos similares, la auracianina A y B entran preferencialmente en las células de cáncer MCF7 y no entraron en las células no cancerosas del control.

Ejemplo 6 - Entrada de la azurina tipo salvaje y la rusticianina varios tipos de 25 células.

La azurina tipo salvaje exhibe una actividad citotóxica reducida hacia las células de MCF-10F según lo contrastado con las células MCF-7 (Punj et al. Oncogen 23: 2367 - 2378 (2004). Las células J774, los macrófagos peritoneales, las células del mástil, la línea celular de cáncer de seno humano MCF-7 y las células epiteliales normales
30 humanas MCF-10F (cultivo en existencia en la colección del Department of Surgical Oncology, University of Illinois at Chicago (UIC), Chicago) fueron tratadas y examinadas como en el ejemplo 5, y probadas para determinar si la azurina tipo salvaje podía entrar a tales células.

La azurina tipo salvaje fue internalizada en las células J774 durante 45 min de incubación. Sin embargo, fue internalizada muy inefficientemente en los macrófagos peritoneales o en las células del mástil. Incluso después de la incubación por 6 horas, tales células mostraron solamente una entrada limitada. Similarmente, mientras que la azurina tipo salvaje entró efficientemente en las células de cáncer de seno MCF-7, mostró un índice extremadamente reducido de entrada en las células mamarias normales MCF-10F.

La azurina conjugada a ALEXA FLUOR® entró efficientemente en células de cáncer UISOMel-2 y MCF-7 pero no en las células mamarias normales MCF 10A1. La rusticianina conjugada a ALEXA FLUOR®, sin embargo, no sólo entró en el citosol de las células de cáncer UISOMel-2 y MCF-7, sino también en las células normales MCF 10A1. A diferencia de lo que ocurre en las células de cáncer, donde la rusticianina fue distribuida uniformemente en el citosol, en las células MCF 10A1, gran parte de la rusticianina fue secuestrada en el espacio perinuclear que rodea al núcleo.

Ejemplo 7 - Inhibición del crecimiento y la citotoxicidad mediada por la azurina tipo salvaje.

Para determinar adicionalmente la especificidad de la entrada de la azurina tipo salvaje en varias células, se determinó la entrada de la azurina tipo salvaje conjugada a ALEXA FLUOR® en células J774, UISO-Mel-2 y fibroblastos normales de durante la incubación a 37 °C por 30 minutos y durante 3.5 horas. Se observó que la azurina tipo salvaje entró rápidamente en las células J774 y UISO-Mel-2 en 30 minutos; muy poca azurina tipo salvaje fue observada en el citosol de los fibroblastos durante este periodo. Después de 3.5 horas de incubación, solamente pequeñas cantidades de azurina tipo salvaje fueron encontradas en los fibroblastos.

Se realizó un ensayo con bromuro de 3(4,5 dimetiltiazol-2-il-2,5 tetrazolium (MTT) para medir la citotoxicidad de la azurina tipo salvaje según lo descrito por Yamada, T., et al. Infect. Immun. 70:7054 - 62 (2002), Goto, M., et al. Mol. Microbiology 47:549 - 59 (2003), y en la solicitud de patente co-pendiente serial número US 10/720.603, presentada el 24 de noviembre de 2003, cuyos contenidos se incorporan como referencia. La figura 1 (b) muestra que la citotoxicidad significativa mediada por azurina tipo salvaje, fue observada solamente con las células J774 y UISO-Mel-2 durante 24 horas de incubación.

La azurina mutante M44KM64E mostró muy poca apoptosis, induciendo actividad en las células J774, pero a la concentración de 1 mg/ml inhibió significativamente la progresión del ciclo celular (aproximadamente en un 95%) en la fase G1 a S. La progresión del ciclo celular fue analizada por citometría de flujo, según lo descrito por

5 Hiraoka, Y. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 101: 6427-32 (2004) y Yamada, T. et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 4770-75 (2004), cuyo contenido se incorpora como referencia. La figura 1(a) muestra que cuando los fibroblastos fueron tratados con 500 µg/ml o 1 mg/ml de la azurina mutante M44KM64E, el grado de inhibición de la progresión del ciclo celular fue de aproximadamente el 20%.

10 **Ejemplo 8 - Microinyección de azurina tipo salvaje en fibroblastos y en células MCF-10F.**

La azurina tipo salvaje fue microinyectada en fibroblastos y en células MCF-10F según lo utilizado en el método descrito por Punj, V., et al, Oncogen 23:2367 - 78 (2004). Las células fueron examinadas para la inducción de apoptosis, conduciendo

15 a la condensación nuclear y a la fragmentación del DNA. Se observó condensación nuclear significativa y fragmentación del ADN (marcado de azul con DAPI) dentro de las células microinyectadas después de la incubación por 5 horas con la azurina tipo salvaje, pero no durante una incubación de 30 minutos con azurina.

20 **Ejemplo 9 - Internalización de los derivados de la fusión de la azurina tipo salvaje a 37 °C.**

Una serie de fusiones de GST y la azurina tipo salvaje, truncadas tanto en los extremos N- y C- terminales, fueron preparadas y purificadas como en el ejemplo 1 (Figura 2 (a) y 2 (b)). Usando la azurina tipo salvaje conjugada a ALEXA FLUOR® 568, GST y los derivados de la fusión de GST-azu, se observó la internalización en

25 las células J774 a 37 °C durante la incubación por 1 hora, usando el método descrito en el ejemplo 5. El núcleo fue teñido de azul con DAPI. Mientras que la azurina tipo salvaje fue internalizada, GST permaneció en la periferia de las células y no fue internalizada. GST-azu 36-128 y GST-azu 36-89 fueron internalizadas, al igual que GST-azu 6-77. Otros truncamientos, sin embargo, mostraron que mientras que GST-

30 azu 50-77 fue internalizada, GST-azu 36-50 fue altamente ineficaz y pareció formar aglomerados en la superficie.

Ejempl 10 - Internalización de los derivados de la fusión de azurina a 4 °C.

Se examinó la internalización de la azurina tipo salvaje y de los derivados de la fusión de GST-azu en las células J774 incubadas a 4 °C. A 4 °C, la internalización de la azurina tipo salvaje dentro de las células J774 durante la incubación por 1 hora se deterioró seriamente. Una debilitación similar también fue observada con GST-azu
5 36-128 y GST-azu 36-89. Los GST-azu 36-77, GST-azu 50-77, GST-azu 50-66 y GST-azu 67-77 más cortos mostraron una debilitación severa de la internalización a 4 °C.

Ejemplo 11 - Internalización dependiente de energía de la proteína de fusión GST-GFP-azu 50-77 en células J774 y melanoma UIO-Mel-2.

10 La GST fue fusionada con la GFP, para hacer un derivado de fusión GST-GFP. Adicionalmente, azu 50-77 fue fusionado a la proteína de fusión GST-GFP (M_r 53 kDa) (Figura 3 (a)). La movilidad de los derivados de la fusión purificados GST, GST-GFP y GST-GFP-azu 50-77 fueron examinados sobre SDS-PAGE (Figura 3 (b)). La detección fue mediante tinción con Azul de Coomassie y por Western blotting usando
15 un anticuerpo anti-azurina (Figura 3 (c)).

La determinación del flujo citométrico de las células J774 tratadas con concentraciones variables de GST-GFP mostró que esta proteína se une a las células J774. La separación por flujo citométrico de las células J774 tratadas con concentraciones incrementadas de la proteína de fusión GST- GFP-azu 50-77
20 demostró fluorescencia significativamente reducida en comparación con GST-GFP solamente (Figura 4). Debe notarse que es conocido que la internalización de GFP en células de mamíferos conlleva a la pérdida de la fluorescencia. Esta reducción de la fluorescencia es también evidente cuando las células J774 se tratan con 200 µg/ml de la proteína de fusión GST- GFP-azu 50-77 y se incuban por periodos de tiempo
25 incrementados a 37 °C.

Para determinar si existe cualquier diferencia en el perfil de unión e internalización de GST-GFP y GST-GFP-azu 50-77, las células J774 y UIO-Mel-2 fueron incubadas con GST-GFP y GST-GFP-azu 50-77 a 37 °C y a 4 °C. La fluorescencia verde fue localizada usando microscopia confocal. En las células J774, la proteína de fusión de
30 GST- GFP se unió a la superficie y no fue internalizada a 37 °C y a 4 °C. En cambio, se encontró que GST-GFP-azu 50-77 se internalizó a 37 °C, pero no a 4 °C. En las células UIO-Mel-2, la proteína de fusión GST-GFP se retuvo en la superficie tanto a 37 °C como a 4 °C. En cambio, similarmente a lo que ocurrió en las células J774, se

observó que la proteína de fusión GST-GFP-azu 50-77 se internalizó a 37 °C pero no a 4 °C.

Ejemplo 12 - Entrada de la azurina tipo salvaje en células de mamíferos mediante una penetración de la membrana celular y un mecanismo endocítico .

- 5 Si la entrada de la azurina tipo salvaje es solamente dependiente de la endocitosis mediada por un receptor, ésta podría ser bloqueada por el protonóforo carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), un desacoplador mitocondrial de generación de energía, o por preincubación con azurina no marcada u otras cupredoxinas que bloquean los receptores. Las células J774 y UISO-Mel-2 fueron incubadas con cupredoxinas a concentraciones 10 veces en exceso por 2 horas a 4 °C, las células
10 fueron lavadas posteriormente para quitar las cupredoxinas, e incubadas con azurina conjugado con ALEXA FLUOR® 568 por 1 hora a 37 °C. Se observó tanta azurina internalizada como en las células no tratadas con las cupredoxinas. Los efectos de la citocalasina D (disponible a partir de Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo 63195), un
15 conocido inhibidor de la endocitosis mediada por receptor que interrumpe la red de microfilamentos celulares, y de la brefeldina A (disponible a partir de Sigma Aldrich, St. Louis, Mo 63195), que se conoce que interrumpe el aparato de Golgi e inhibe la secreción clásica mediada por vesícula, también fueron probados. El CCCP a la concentración de 20 pM redujo significativamente la incorporación de la azurina en
20 las células UISO-Mel-2 al igual que la citocalasina D a 0.25 - 0.5 pM. La brefeldina A, por otra parte, no tuvo ningún efecto significativo.

Ejemplo 13 - Entrada de un derivado de la fusión GST-PEDIII-azu 50-77 en las células UISO- Mel-2.

- Una fusión de GST y el dominio III (PEDIII) de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* fue construida según lo descrito por Hwang, J. et al, Cell 48:129 - 36
25 (1987); Reiter, Y. and Pastan, L., Trends Biotechnol. 16:513 - 20 (1998). Este derivado de la fusión de GST-PEDIII contenía los aminoácidos 381-613 de la exotoxina A. Se conoce que PEDIII presenta actividad ADP-ribosil transferasa e inhibe la síntesis de proteínas en las células eucarióticas, mediante la inhibición del
30 factor 2 de la elongación eucariótica.

Usando PCR según lo descrito para GST-GFP-azu 50-77, la secuencia azu 50-77 fue introducida al extremo carboxilo de la proteína de fusión GST-PEDIII (Figura 5 (a)). Estas dos proteínas de fusión (GSTPEDIII y GST-PEDIII-azu 50-77) fueron

purificadas por cromatografía en columna de glutatión-sefarosa 4B como proteínas de 52 y 54 kDa (Figura 5 (b)). Las células UISO-Mel-2 y los fibroblastos normales (FBT) fueron entonces incubados por 24 h a 37 °C con varias concentraciones de estas proteínas, y el grado de muerte celular fue medido por ensayo de MTT según lo descrito en el ejemplo 7.

Mientras que GST-PEDIII demostró solamente baja citotoxicidad, la proteína de fusión GST-PEDIII-azu 50-77 tuvo alta citotoxicidad debido a la entrada eficiente a las células UISO-Mel-2 (Figura 5 (c)). En cambio, las proteínas de fusión demostraron un bajo nivel de citotoxicidad hacia las células de fibroblastos.

10 **Ejemplo 14 – La desestabilización de la α -hélice en la azurina tipo salvaje n tiene ningún efecto sustancial en su internalización en las células UISO-Mel-2.**

Para examinar si la α -hélice desempeña un papel importante en la entrada de la azurina a las células, tres residuos de prolina, desestabilizantes de la hélice, fueron introducidos en las posiciones 54, 61 y 70 de la azurina tipo salvaje (Figura 6) y se examinó la entrada de la azurina de longitud completa y del mutante A54PT61PK70P en las células UISO-Mel-2. Las mutaciones simples y dobles en estas posiciones también fueron construidas y probadas para la entrada. La azurina mutante A54PT61PK70P fue preparada por mutagénesis sitio-dirigida del gen de la azurina usando el kit de mutagénesis sitio-dirigida QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA).

20 Los mutantes fueron incubados a 200 μ g/ml con las células UISO-Mel-2 por 1 hora a 37 °C, después de lo cual la fluorescencia fue localizada por microscopia confocal. En todos los casos, las azurinas mutantes conjugadas a ALEXA FLUOR® 568 entraron en las células UISO-Mel-2. Similarmente, cuando la proteína de fusión de GST-GFP-azu 50-77, así como su variante triple mutante A54PT61PK70P azu, fue examinada para la entrada en las células UISO-Mel-2, no se observó ninguna diferencia significativa.

Ejemplo 15 - Entrada de un derivado de la fusión GST-PEDIII-Rusticianina en las células UISO-Mel-2.

30 Una fusión de GST y el dominio III (PEDIII) de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* fue construida como en el ejemplo 13. Usando PCR según lo descrito para el GST- GFP-azu 50-77, la secuencia de longitud completa de la rusticianina fue introducida en el extremo carboxilo de la proteína de fusión GST-PEDIII. La proteína de fusión fue purificada por cromatografía de columna de glutatión-sefarosa 4B. Las

células UISO-Mel-2 y FBT entonces fueron incubadas por 24 h a 37 °C con varias concentraciones de la proteína de fusión, y el grado de la muerte celular fue medido por un sayo de MTT según lo descrito en el ejemplo 7.

La proteína de fusión GST-PEDIII-rusticianina exhibió alta citotoxicidad contra las células UISO-Mel-2 (Figura 7). En cambio, la proteína de fusión demostró solamente un nivel bajo de citotoxicidad hacia las células FBT.

Ejemplo 16 - Competición de la Azurina con GST-Azu 55-77 para la entrada en las células J774.

Un experimento de competición fue realizado con la azurina sin marcar a 37 °C en presencia de 7 µM de GST-azu 50-77 conjugada ALEXA FLUOR®. Las células J774 fueron incubadas sin azurina conjugada a ALEXA FLUOR®, con GST-azu 50-77 conjugada a ALEXA FLUOR® (7 µM) y con GST-azu 50-77 conjugada a ALEXA FLUOR® (7 µM) en presencia de 7, 14 y 56 µM de azurina sin marcar por 1 h a 37 °C, antes de determinar la entrada de GST-azu 50-77. Los resultados claramente demostraron que en comparación a 7 µM GST-azu 50-77 marcada solamente, la presencia de cantidades de aumento de azurina sin marcar (7, 14 y 56 µM) compitió cada vez más con la entrada de 7 µM GST-azu 50-77 marcada. En cambio, cuando se utilizaron concentraciones similares (6, 12 y 48 µM) de rusticianina marcar en presencia de GST-azu 50-77 marcada, se observó muy poco efecto sobre la entrada de GST-azu 50-77.

Ejemplo 17 - Secuencia y comparación estructural del dominio de transducción de la proteína Azurina (PTD) con otras cupredoxinas.

La identidad de secuencia entre la azurina y la rusticianina en la región azu 50-77 es menos del 20%, al igual que lo es para varias otras cupredoxinas (De Rienzo et al, Protein Science 9:1439 - 1454, 2000; Murphy et al, J. Mol. Biol. 315:859 - 871, 2002). Un análisis estructural usando el algoritmo VAST (Gibrat et al, Curr. Opin. Struct. Biol. 6:377 - 385, 1996) entre la azurina y varios miembros de la familia de las cupredoxinas, demostraron una identidad significativa entre la región azu 50-77 y la de la cupredoxina auracianina B, una de las cupredoxina provenientes de la bacteria fotosintética termofílica verde *C. aurantiacus* (Bond et al, J. Mol. Biol. 306:47 - 67, 2001). Otros miembros de la familia de las cupredoxinas, mientras que muestra semejanza estructural con otras regiones de la azurina, carecieron de identidad significativa con la azurina PTD, aminoácidos 50-77 (Fig. 8 (a)). De hecho, cuando se

compara con otras proteínas cuyas estructuras se han depositado en la base de datos proteínas, hubo semejanza estructural muy pequeña entre el azu PTD y otras proteínas.

Una alineación múltiple de las secuencias de aminoácidos de los residuos en la
 5 región PTD de *P. aeruginosa* con secuencias conocidas de otras azurinas bacterianas provenientes de patógenos, usando el programa de alineación CLUSTAL X (Higgins and Sharp, id. 1988). Mientras que la azurina del fitopatógeno *P. syringae* demostró alta identidad con la región PTD de la azurina de *P. aeruginosa*, una proteína similar a azurina de *Neisseria meningitidis* (Gotschlich y Seiff, FEMS
 10 Microbiol. Lett. 43:253 - 255 (1987); Kawula et al, Mol. Microbiol. 1:179 - 185 (1987); Cannon, Clin. Microbiol. Rev. 2:S1-S4 (1989)) también mostró identidad significativa con el dominio PTD de la azurina de *P. aeruginosa*, al igual que las azurinas provenientes de *Vibrio parahaemolyticus* y de *Bordetella bronchiseptica* (Fig. 8 (b)). Una secuencia motivo D-G-X-X-X-X-X-D-X-X-Y-X-K-X-X-D (IDENTIFICACIÓN DE
 15 SEC. NO.: 35) se encontró conservada en todas estas azurinas.

Ejemplo 18 - Laz de *N. meningitidis* (H8-azurina) induce la muerte celular en células de tumor cerebral LH229.

Neisseria meningitidis (Nm) causa meningitis cerebrospinal, diseminándose en torrente sanguíneo, cruzando la barrera hemato-encefálica, presumiblemente por una
 20 ruta transcelular a través de las células endoteliales del cerebro, e invadiendo las meninges. Las azurinas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Neisseria meningitidis* tienen estructuras similares y alta homología en secuencia de aminoácidos (>50%). Adicionalmente, la azurina de *N. meningitidis* es parte de un polipéptido más largo, Laz (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 30), que se encuentra en su N-terminal, un
 25 péptido superficial llamado H8, el cual está presente en la membrana externa de *N. meningitidis* (Cannon, J.G., Clin. Microbiol. Rev. vol. 2, pp. 51-54 (1989)). El epítipo antigénico H8 expuesto en la superficie también porta una señal para la lipidación. La proteína completa H8 de la membrana externa de *N. meningitidis* se mantiene en la superficie externa de las células de *N. meningitidis*.

30 La proteína Laz de *Neisseria gonorrhoeae* es muy similar a la proteína Laz de *N. meningitidis*. El gen laz de *Neisseria gonorrhoeae* fue clonado en *E. coli*, y entonces dicho gen fue hiper-expresado en *E. coli* para producir la proteína Laz (Fig. 13). La capacidad de la azurina purificada de *P. aeruginosa* y de la proteína Laz purificada *Neisseria gonorrhoeae* para inducir muerte celular en la línea celular LH229 de tumor

cerebral, según lo medido por un ensayo de MTT (Yamada, T., et al., Cell Cycle vol. 3, pp 1182-1187 (2004)). Mientras que la azurina de *P. aeruginosa*, cuando es expresado en *E. coli*, está presente en el periplasma, la proteína Laz, cuando es expresada en *E. coli*, fue encontrada en la membrana externa de *E. coli*. Además,

5 mientras que la azurina tuvo una citotoxicidad muy baja hacia las células del tumor cerebral en el plazo de 24 horas, Laz mostró alta citotoxicidad, permitiendo la muerte del 90% de las células del tumor cerebral en 24 horas (Tabla 3). La azurina mostró citotoxicidad incrementada luego de 48 horas (Tabla 4). Este experimento indica ese

10 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 36) serán útiles para diagnosticar y/o para tratar tumores cerebrales *in vitro* e *in vivo*. Si Laz reduce el crecimiento del tumor cerebral *in vivo*, todo o una parte de la proteína será utilizada como "el dominio de entrada de la cupredoxina" de la invención para transportar las moléculas transportadoras, incluyendo marcadores radioactivos o fluorescentes o fármacos/toxinas que

15 destruyen los tumores en el cerebro, y en las células tumorales del cerebro, para los propósitos de diagnóstico o terapéuticos.

Tabla 3. Citotoxicidad de la azurina de *P. aeruginosa* y de la proteína Laz de *N. gonorrhoeae* para la línea celular LH229 de cáncer cerebral después de 24 horas de incubación.

Proteína	Conc.	Citotoxicidad (%)	STDEV
<i>P. aeruginosa</i> azurin	0	0.00	0.00
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	0	0.00	0.00
<i>P. aeruginosa</i> azurin	25	5.86	2.45
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	25	18.80	1.26
<i>P. aeruginosa</i> azurin	50	5.48	2.43
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	50	23.59	1.57
<i>P. aeruginosa</i> azurin	100	6.00	4.13
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	100	41.02	1.49
<i>P. aeruginosa</i> azurin	200	8.27	4.79
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	200	78.99	2.06
<i>P. aeruginosa</i> azurin	400	7.25	3.69
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	400	94.69	0.87
<i>P. aeruginosa</i> azurin	800	13.22	7.67
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	800	98.36	0.62

5 Tabla 4. Citotoxicidad de la azurina de *P. aeruginosa* y de la proteína Laz de *N. gonorrhoeae* para la línea celular LH229 de cáncer cerebral después de 48 horas de incubación.

Proteína	Conc. (µg/ml)	Citotoxicidad (%)	STDEV
<i>P. aeruginosa</i> azurin	0	0.00	0.00
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	0	0.00	0.00
<i>P. aeruginosa</i> azurin	25	11.65	1.07
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	25	20.04	4.25
<i>P. aeruginosa</i> azurin	50	8.55	2.51
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	50	25.52	1.80
<i>P. aeruginosa</i> azurin	100	16.19	2.60
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	100	39.72	0.92
<i>P. aeruginosa</i> azurin	200	16.30	1.91
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	200	87.01	1.21
<i>P. aeruginosa</i> azurin	400	61.98	19.15
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	400	98.75	0.96
<i>P. aeruginosa</i> azurin	800	82.71	5.91
<i>N. gonorrhoeae</i> Laz	800	99.93	0.12

Ejemplo 19 - Citotoxicidad de la proteína Laz de *Neisseria gonorrhoeae* para las células de tumores cerebrales.

Varios plásmidos fueron contruidos que codifican construcciones de proteínas que incluyen la azurina de *P. aeruginosa*, la proteína Laz de *Neisseria gonorrhoeae* (IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 36), y proteínas de fusión, y las proteínas se probaron en un ensayo de MTT con líneas celulares de tumores cerebrales. Las construcciones de proteínas probadas incluyen la región H.8 de Laz de *N. gonorrhoeae* solamente, la azurina de *P. aeruginosa* solamente, la azurina *N. gonorrhoeae* solamente, y las construcciones representadas en la Figura 10. Los plásmidos que codifican las construcciones de proteínas se transformaron en *E. coli* u otro sistema de expresión apropiado, y las construcciones proteína son expresadas y las proteínas resultantes son purificadas. Las líneas celulares de tumores cerebrales incluyen NL229 y CCF-STTG1.

Los resultados de este experimento indican que la región H.8 y/o la azurina del gen Laz son requeridas para permitir que la construcción de la proteína sea citotóxica para las células del tumor cerebral. Este experimento también determina si otras azurinas son más citotóxicas para las células del tumor cerebral si están fusionados a la región H.8. Los resultados de este experimento indican que la región H.8 puede adaptar una cupredoxina para ser citotóxica para la célula de cáncer del cerebro, transportando la azurina unida a las células de cáncer del cerebro. Por consiguiente, H.8 se puede utilizar como dominio de transporte para transportar una molécula transportadora en las células de cáncer del cerebro. Las cargas útiles incluyen tratamientos del cáncer y agentes de diagnóstico según lo conocido en el arte y dispuesto aquí.

Ejemplo 20 - Tratamiento de los pacientes que sufren de cáncer.

Un ensayo clínico de fase I/II de una fusión del dominio III de la exotoxina A y el dominio de entrada de una cupredoxina (fármaco en estudio) será realizado en los pacientes que sufren de cáncer. Específicamente, el dominio de entrada de la cupredoxina es la región de aminoácidos 50-67 de *Pseudomonas aeruginosa* y el dominio III de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* es el transportador, haciendo la proteína de fusión "PEDIII-azu 50-67" Esta proteína de fusión será construida según lo ilustrado en el ejemplo 13.

Cuarenta y nueve pacientes adultos con cánceres de seno, colon y melanoma verificados histológicamente, que muestran progresión o recurrencia clínica y radiográfica siguiendo al tratamiento y régimen adecuado con los fármacos quimioterapéuticos aprobados por la FDA actualmente disponibles, serán incluidos en un estudio prospectivo abierto, administrando el fármaco en estudio. Para ser elegibles para la inscripción en el estudio, todos los pacientes muestran volumen en aumento del tumor mensurable después de la terminación del curso aprobado de los regímenes de quimioterapia. La evidencia de depósitos metastásicos persistentes y/o aumento continuado del tamaño o volumen debe ser histológicamente establecido. Esta prueba histológica se puede obtener por una biopsia por aspiración con aguja fina (FNA).

El programa de tratamiento será instituido después de obtener consentimiento informado de todos los pacientes de acuerdo con el comité examinador institucional de la universidad de Illinois, de Chicago y la FDA. Los pacientes no tendrán ninguna enfermedad intercurrente tal como otra malignidad, historia de malignidad anterior, discrasias de la sangre, diabetes dependiente de insulina u otras enfermedades cardiovasculares serias que pudieran interferir en la evaluación apropiada de los efectos de la terapia propuesta. El trabajo de los valores iniciales de la sangre (conteos completos de sangre [CBC] y química del suero) incluyendo estudios de la función hepática (LFT) serán realizados antes de la iniciación de la terapia. Todos los pacientes elegibles no deben recibir ninguna quimioterapia para el cáncer concurrentemente durante el periodo del ensayo. Los fármacos en estudio serán administrados por inyección intravenosa diaria de una preparación terapéuticamente aceptable del fármaco en estudio por 12 semanas y los sujetos serán observados para cualquier dosis que limite la toxicidad. Habrá 7 niveles de dosis, comenzando con 10 mg/kg/día y aumento en 5 mg/kg/día hasta una dosis máxima de 50 mg/kg/día. La eficacia de cada nivel de dosis será registrada en 7 pacientes con el cáncer mensurable avanzado (seno, colon, y melanoma). La respuesta será estimada midiendo el tumor mensurable en 2 dimensiones (a y b). 1) La desaparición total de los tumores metastásicos blanco será considerada como respuesta completa (CR); 2) Una reducción del 75% será considerada una respuesta parcial excelente, (PR); y 3) Una buena respuesta (PR) será la reducción del 50% del tamaño post-tratamiento 4) Una reducción del 25% del tamaño será considerada como enfermedad estable (SD) y 5) < 25% será considerado como ninguna respuesta

(NR). Los pacientes que muestran una progresión de la enfermedad tendrán su tratamiento continuado pero serán seguidos por unas 12 semanas adicionales.

La desaparición total, y cualquier reducción de tamaño de los tumores metastásicos blanco indicarán que el tratamiento de la azurina es eficaz para tratar el cáncer.

- 5 Otras indicaciones de que el tratamiento de la azurina es eficaz, son un índice de disminución en la aparición de tumores metastásicos nuevos y una disminución de la angiogénesis asociada a los tumores.

- Varias modificaciones y variaciones de los ejemplos y de los sistemas descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la materia sin salirse del alcance y el espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a materializaciones específicas, debe ser entendido que la invención según se ha reivindicado, no se debe limitar indebidamente a tales materializaciones específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para realizar la invención que son obvias para aquellos expertos en campos relacionados, se conciben dentro
- 10
- 15 del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido, que consiste de una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos cuando menos para una cupredoxina tipo salvaje de longitud completa o para la proteína de la membrana externa H.8, y que facilita la entrada de una molécula enlazada en una célula de cáncer de mamífero.
2. El péptido de la reivindicación 1, donde la cupredoxina se selecciona del grupo consistente de azurina, plastocianina, rusticianina, pseudoazurina, auracianina y proteína similar a la azurina.
3. El péptido de la reivindicación 1, donde el péptido se deriva de un organismo seleccionado del grupo que consiste de *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Chloroflexus aurantiacus* y *Neisseria gonorrhoeae*.
4. El péptido de la reivindicación 1, donde la cupredoxina se selecciona del grupo que consiste de la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 1, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 2, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 3, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 4, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 29, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 30, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 31, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 32, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 33, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 34, la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 36 y la IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43.
5. El péptido de la reivindicación 1, el cual es al menos de aproximadamente 10 residuos y no más de aproximadamente 50 residuos en longitud.
6. El péptido de la reivindicación 1, que comprende una secuencia que tiene al menos identidad en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 90% para una secuencia seleccionada del grupo que consiste de IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9, SEQ NO. DE LA IDENTIFICACIÓN: 37, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43,

IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47, e IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47.

7. El péptido de la reivindicación 6, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5, IDENTIFICACIÓN DE
5 SEC. NO.: 6, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 37, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44,
10 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47, e IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47.

8. El péptido de la reivindicación 6, que consiste de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 5, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 6, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 7, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 9,
15 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 37, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 38, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 39, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 40, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 41, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 42, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 43, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 44, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 46, IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47, e
20 IDENTIFICACIÓN DE SEC. NO.: 47.

9. El péptido de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de

DGXXXXDXXYXKXXD y DGXXXXDXXYXKXXD,

donde D es ácido aspártico, G es glicina, Y es tirosina, K es lisina y X es cualquier
25 aminoácido.

10. Un péptido que tiene homología estructural significativa para los 50-77 aminoácidos de la región de la azurina de *Pseudomonas aeruginosa* y que facilita la entrada de una molécula enlazada en una célula de cáncer de mamífero.

11. Un complejo que comprende un compuesto transportador y un péptido, donde el
30 péptido tiene al menos identidad de secuencia de aproximadamente el 90% con una cupredoxina o un fragmento de la misma, donde el péptido, o los fragmentos de este,

se enlazan al compuesto transportador, y donde el péptido facilita la entrada del compuesto transportador en una célula de cáncer de mamífero.

12. El complejo de la reivindicación 11, donde el péptido es el péptido de la reivindicación 1.

5 13. El complejo de la reivindicación 11, donde el compuesto transportador se selecciona del grupo que consiste de una proteína, una lipoproteína, un polipéptido, un péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, un pigmento, una micropartícula, una nanopartícula, una toxina y un fármaco.

10 14. El complejo de la reivindicación 13, donde el compuesto transportador se selecciona del grupo que consiste de una proteína y un polipéptido, y donde el péptido se enlaza al compuesto transportador para formar una proteína de fusión.

15. El complejo de la reivindicación 11, donde el compuesto transportador es una toxina.

15 16. El complejo de la reivindicación 15, donde la toxina es la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un fragmento de la misma.

17. El complejo de la reivindicación 11, donde el compuesto transportador es una sustancia detectable.

20 18. El complejo de la reivindicación 17, donde la sustancia detectable es detectable por un método seleccionado a partir del grupo que consiste de fluorimetría, microscopia, rayos X CT, MRI y ultrasonido.

19. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de la reivindicación 11 con un portador farmacéuticamente apropiado.

20. Un método que comprende poner en contacto una célula o células con el complejo de la reivindicación 11.

25 21. El método de la reivindicación 20, donde la célula o las células se originan de un paciente que sufre de cáncer, y posteriormente comprende la reintroducción de la célula o las células en el paciente.

22. El método de la reivindicación 20, donde la célula es una célula de cáncer.

30 23. El método de la reivindicación 22, donde la célula es una célula de cáncer seleccionada a partir del grupo que consiste de una célula de osteosarcoma, una célula de carcinoma de pulmón, una célula de carcinoma de colon, una célula de

linfoma, una célula de leucemia, una célula sarcoma de tejido blando, una célula de carcinoma de seno, una célula de carcinoma de hígado, una célula de carcinoma de vejiga, una célula de melanoma, una célula de tumor cerebral y una célula de carcinoma de próstata.

- 5 24. Un método de tratar a un paciente con cáncer, donde el complejo de la reivindicación 11 se administra a dicho paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva.

25. El método de la reivindicación 24, donde el complejo se administra de una manera seleccionada del grupo que consistía de administración intravenosa, tópica,
10 subcutánea, intramuscular, y en el tumor.

26. El método de la reivindicación 24, donde el complejo se administra conjuntamente con otro tratamiento para el cáncer.

27. Un método para la proyección de imagen de cáncer en un paciente, donde el complejo de la reivindicación 17 se administra a dicho paciente, y se detecta la
15 localización del compuesto transportador.

28. El método de la reivindicación 27, donde el compuesto transportador es un agente del contraste para rayos X y se detecta la localización del compuesto transportador por rayos X CT.

29. El método de la reivindicación 27, donde el compuesto transportador es un
20 agente de contraste para la proyección de imagen por resonancia magnética y se detecta la localización del compuesto transportador por MRI.

30. El método de la reivindicación 27, donde el compuesto transportador es un agente de contraste para ultrasonido y se detecta la localización del compuesto transportador por proyección de imagen por ultrasonido.

- 25 31. Un método para diagnosticar cáncer, donde una célula se pone en contacto con el complejo de la reivindicación 17 y se detecta la localización de la molécula transportadora.

32. Un conjunto que comprende un reactivo que comprende el complejo de la reivindicación 11.

- 30 33. El conjunto de la reivindicación 32, que comprende adicionalmente un reactivo que comprende un adyuvante o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

34. El conjunto de la reivindicación 32, que comprende adicionalmente un vehículo para la administración del reactivo.
35. El péptido de la reivindicación 1, donde la estructura del péptido se modifica para prolongar o para optimizar la vida media del péptido en el torrente sanguíneo
- 5 36. Una molécula de ácido nucleico, que codifica el péptido de las reivindicaciones 1 ó 10, o el complejo de la reivindicación 14.

RESUMEN

La presente invención divulga métodos y materiales para la entrega de un compuesto transportador dentro de una célula de cáncer. La entrega del compuesto transportador se logra mediante el uso de los dominios de transducción de las proteínas derivados de las cupredoxinas. La invención además divulga métodos para el tratamiento y diagnóstico del cáncer.

FIG.1a

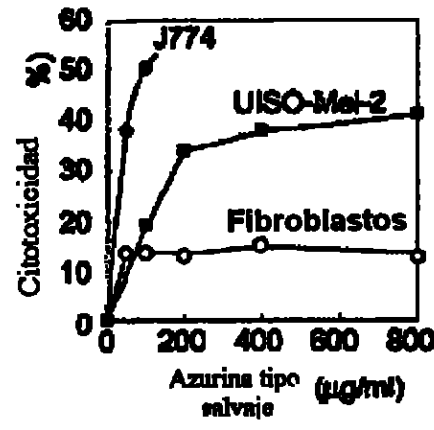


FIG.1b

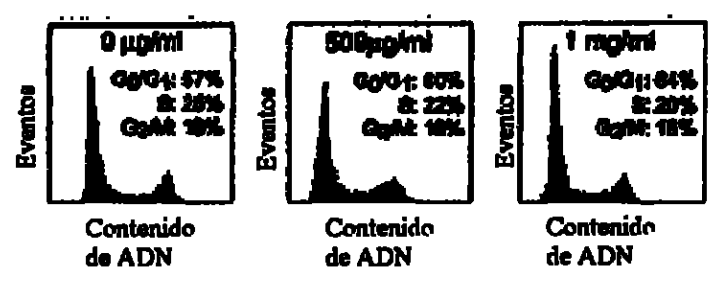


FIG. 2a

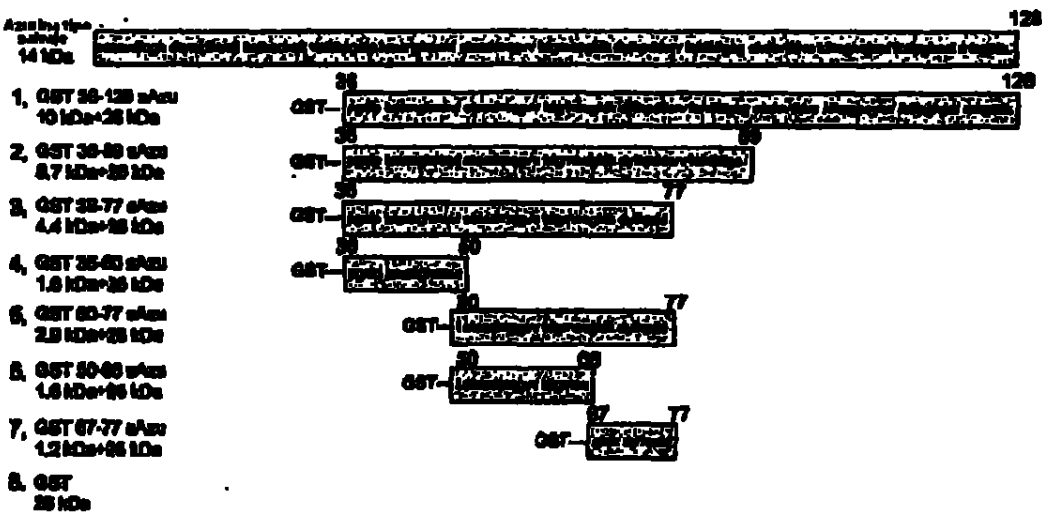


FIG. 2b

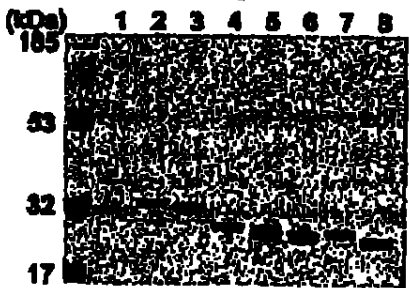


FIG. 3a

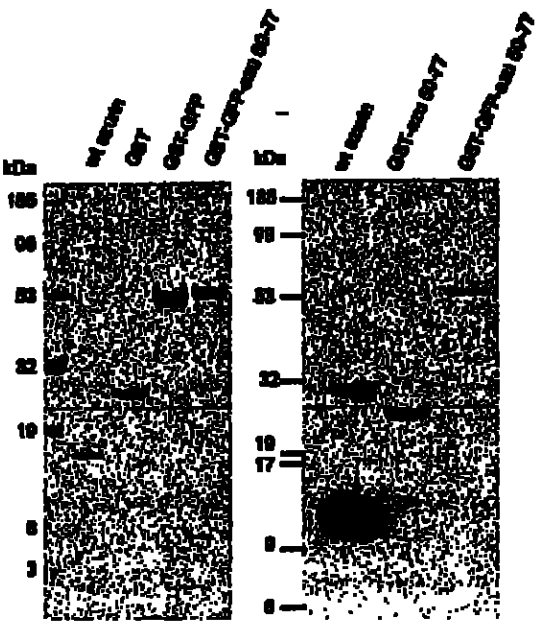


FIG. 3b

FIG. 3c

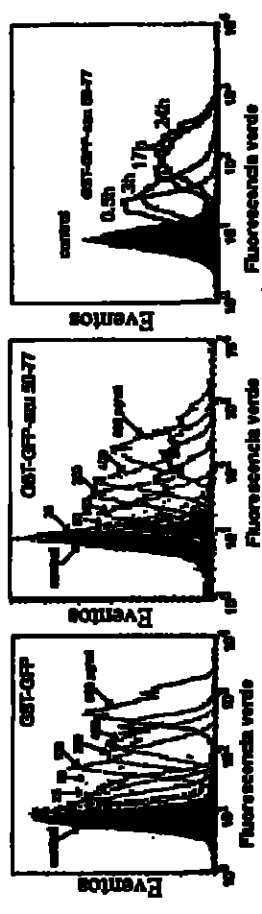


FIG. 4a

FIG. 4b

FIG. 4c

5/10

FIG. 5a

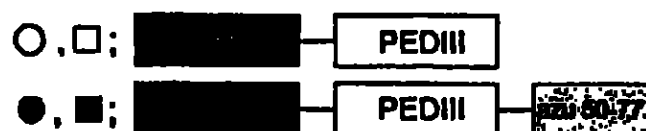


FIG. 5b

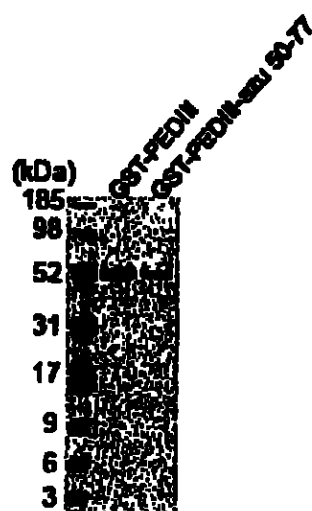
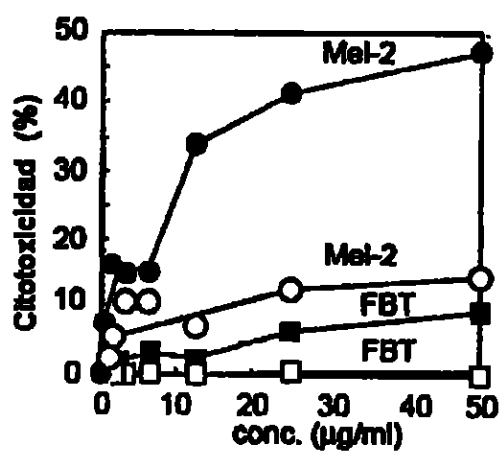


FIG. 5c



6/10

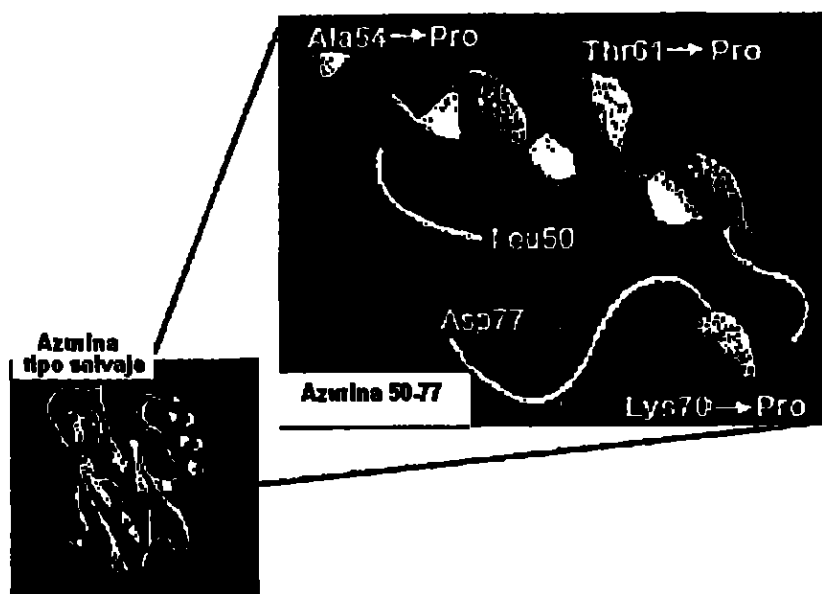


FIG. 6

7/10

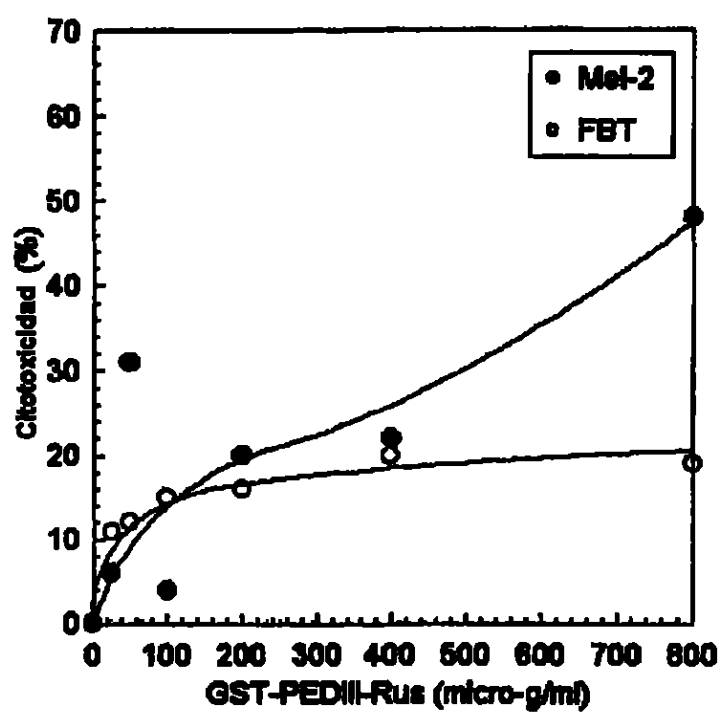


FIG. 7

FIG. 8a

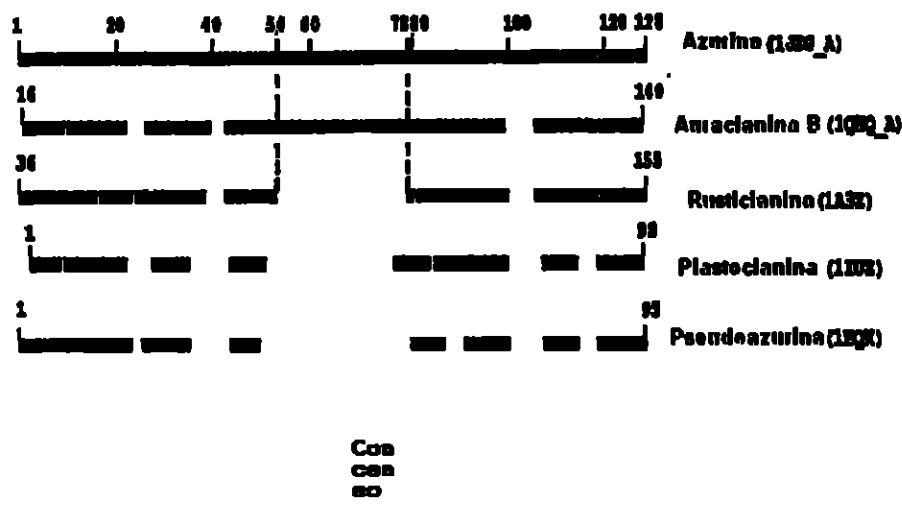


FIG. 8b

Microrganismo	Número de Acceso
Pras	AB08307 (51) -GTADNCGVVTGNSAGLDKDYKFD (77)
Pasy	AB08351 (51) -SGGADABATTTGNSVGLDNDYVKFD (77)
Nema	AAF41800 (89) -LAKAEDNDGVTFDQVGA-ADTDYVKFD (115)
Vipa	WP_000910 (92) -ADTATTCAGVTDGNSAGADNSYVKFD (70)
Rubr	A28R (91) -TKTADNCAVETDGTAGLDNDYKFD (77)
Consensus	DS D Y K D

E

71

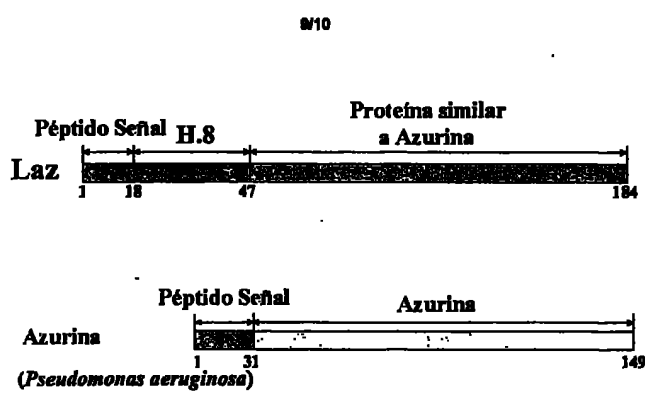


FIG. 9 Arte Anterior

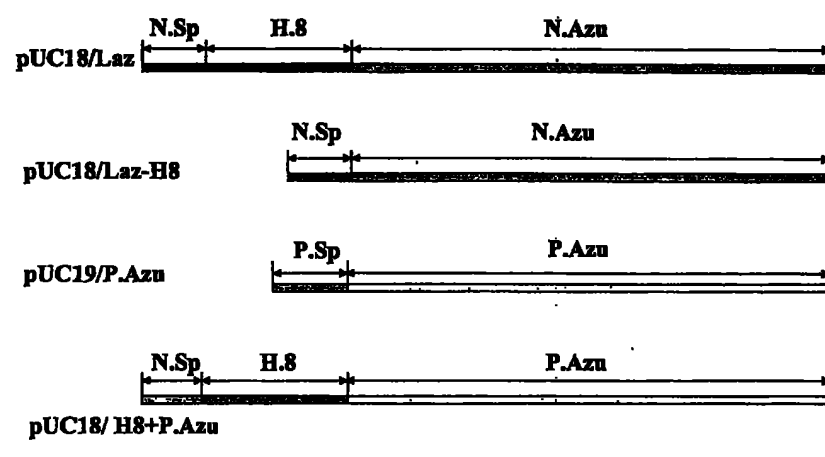


FIG. 10

10/10

22

172

PCT/US05/35758

SEQUENCE LISTING

<110> Chakrabarty, Ananda
Das Gupta, Tapas
Yamada, Tohru
Fialho, Arsenio

<120> Cupredoxin Derived Transport Agents and Methods of Use Thereof

<130> 51282-00009

<140> Not assigned
<141> 2005-10-06

<150> 60/616,782
<151> 2004-10-07

<150> 60/680,500
<151> 2005-05-13

<150> 60/700,297
<151> 2005-07-19

<160> 48

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 1

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

PCT/US05/35758

Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys
100 105 110

Thr Phe Pro Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Thr Leu Lys
115 120 125

<210> 2
<211> 105
<212> PRT
<213> Phormidium laminosum

<400> 2

Glu Thr Phe Thr Val Lys Met Gly Ala Asp Ser Gly Leu Leu Gln Phe
1 5 10 15

Glu Pro Ala Asn Val Thr Val His Pro Gly Asp Thr Val Lys Trp Val
20 25 30

Asn Asn Lys Leu Pro Pro His Asn Ile Leu Phe Asp Asp Lys Gln Val
35 40 45

Pro Gly Ala Ser Lys Glu Leu Ala Asp Lys Leu Ser His Ser Gln Leu
50 55 60

Met Phe Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Glu Ile Thr Phe Ser Ser Asp Phe
65 70 75 80

Pro Ala Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Cys Ala Pro His Arg Gly Ala Gly
85 90 95

Met Val Gly Lys Ile Thr Val Glu Gly
100 105

<210> 3
<211> 155
<212> PRT
<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 3

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

Ala Met Leu Glu Lys Asp Thr Gly Lys Val Ser Gly Asp Thr Val Thr
20 25 30

PCT/US05/3575R

Tyr Ser Gly Lys Thr Val His Val Val Ala Ala Ala Val Leu Pro Gly
35 40 45

Phe Pro Phe Pro Ser Phe Glu Val His Asp Lys Lys Asn Pro Thr Leu
50 55 60

Glu Ile Pro Ala Gly Ala Thr Val Asp Val Thr Phe Ile Asn Thr Asn
65 70 75 80

Lys Gly Phe Gly His Ser Phe Asp Ile Thr Lys Lys Gly Pro Pro Tyr
85 90 95

Ala Val Met Pro Val Ile Asp Pro Ile Val Ala Gly Thr Gly Phe Ser
100 105 110

Pro Val Pro Lys Asp Gly Lys Phe Gly Tyr Thr Asp Phe Thr Trp His
115 120 125

Pro Thr Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Val Cys Gln Ile Pro Gly His Ala
130 135 140

Ala Thr Gly Met Phe Gly Lys Ile Val Val Lys
145 150 155

- <210> 4
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Achromabacter cycloclastes
- <400> 4

Ala Asp Phe Glu Val His Met Leu Asn Lys Gly Lys Asp Gly Ala Met
1 5 10 15

Val Phe Glu Pro Ala Ser Leu Lys Val Ala Pro Gly Asp Thr Val Thr
20 25 30

Phe Ile Pro Thr Asp Lys Gly His Asn Val Glu Thr Ile Lys Gly Met
35 40 45

Ile Pro Asp Gly Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Ile Asn Glu Asn Tyr
50 55 60

PCT/US05/35758

Lys Val Thr Phe Thr Ala Pro Gly Val Tyr Gly Val Lys Cys Thr Pro
65 70 75 80

His Tyr Gly Met Gly Met Val Gly Val Val Gln Val Gly Asp Ala Pro
85 90 95

Ala Asn Leu Glu Ala Val Lys Gly Ala Lys Asn Pro Lys Lys Ala Gln
100 105 110

Glu Arg Leu Asp Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Asn
115 120

<210> 5
<211> 93
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser
1 5 10 15

Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser Gly
20 25 30

Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val Ile Ala His
35 40 45

Thr Lys Leu Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr Phe Asp Val
50 55 60

Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys Thr Phe Pro
65 70 75 80

Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Thr Leu Lys
85 90

<210> 6
<211> 54
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser
1 5 10 15

PCT/U505/35758

Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser Gly
20 25 30

Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val Ile Ala His
35 40 45

Thr Lys Leu Ile Gly Ser
50

<210> 7
<211> 42
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 7

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser
1 5 10 15

Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser Gly
20 25 30

Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
35 40

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 8

Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu
1 5 10 15

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 9

Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala
1 5 10 15

Ser Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
20 25

PCT/US05/35758

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 10

Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala
 1 5 10 15

Ser

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 11

Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
 1 5 10

<210> 12
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> forward primer for pGST-azu 36-128

<400> 12
 cgggatcccc ggcaacctgc cgaagaacgt catgggc 37

<210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse primer for pGST-azu 36-128

<400> 13
 cgggaattcgc atcacttcag ggtcaggg 28

<210> 14
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

PCT/US09/35758

<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 36-50

<400> 14
ggccacaact gggtagctgtg aaccgcccgc gacatgcag 39

<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 36-50

<400> 15
ctgcatgtcg gcggcggttc acagtaccca gttgtggcc 39

<210> 16
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 36-77

<400> 16
cctgaagccc gacgactgac gtgtcatcgc ccacacc 37

<210> 17
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 36-77

<400> 17
gggtgtgggcg atgacacgtc agtcgtcggg cttcagg 37

<210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 36-89

<400> 18
ccaagctgat cggctcgtga gagaaggact cggtgacc 38

<210> 19
<211> 38
<212> DNA

PCT/USNS/35758

<213> Artificial sequence

<220>

<223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 36-89

<400> 19
ggtcaccgag tccttctctc acgagccgat cagcttgg 38

<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward primer for pGST-azu 50-77

<400> 20
cgggatcctg agcaccgccg ccgacatgca ggg 33

<210> 21
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward primer for pGST-azu 67-77

<400> 21
cgggatcccc ggcctggaca aggattacct gaagcccg 38

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for pGST-azu 50-77 and pGST-azu 67-77

<400> 22
cggaattcgc atcacttcag ggtcaggg 28

<210> 23
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> forward oligonucleotide for pGST-azu 50-66

<400> 23
gacggcatgg cttcctgact ggacaaggat tacc 34

PCT/US05/35758

<210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse oligonucleotide for pGST-azu 50-66

<400> 24
 ggtaatcctt gtccagtcag gaagccatgc cgtc 34

<210> 25
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> forward primer for green fluorescence protein gene

<400> 25
 cggtatcccc atggtgagca agggcg 26

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse primer for green fluorescence protein gene

<400> 26
 cggaattcct tgtacagctc gtccatgccg 30

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> forward primer for gst-gfp-azu 50-77

<400> 27
 ccgctcgagc ctgagcaccg ccgccatgca ggg 33

<210> 28
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> reverse primer for gst-gfp-azu 50-77

<400> 28

PCT/US05/35758

ttttcctttt gcggccgctc agtcgctggg cttcaggtaa tcc

43

<210> 29
<211> 136
<212> PRT
<213> Pseudomonas syringae

<400> 29

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

Ser Thr Asp Gln Met Met Tyr Asp Thr Lys Ala Ile Gln Ile Asp Lys
20 25 30

Ser Cys Lys Glu Phe Thr Leu Asn Leu Thr His Ser Gly Ser Leu Pro
35 40 45

Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp Val Leu Ser Lys Lys Ala Asp Ala
50 55 60

Ser Ala Ile Thr Thr Asp Gly Met Ser Val Gly Ile Asp Lys Asp Tyr
65 70 75 80

Val Lys Pro Asp Asp Thr Arg Val Ile Ala His Thr Lys Ile Ile Gly
85 90 95

Ala Gly Glu Asn Asp Ser Val Thr Phe Asp Val Ser Lys Leu Asp Pro
100 105 110

Ala Glu Asp Tyr Gln Phe Phe Cys Thr Phe Pro Gly His Ile Ser Met
115 120 125

Met Lys Gly Ala Val Thr Leu Lys
130 135

<210> 30
<211> 183
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

<400> 30

Met Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Ile Ser Ala Ala Val Ile Gly Leu Ala
1 5 10 15

PCT/USD5/35754

Ala Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala
20 25 30

Ala Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala
35 40 45

Asp Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu
50 55 60

Ser Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys
65 70 75 80

Ala Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro
85 90 95

Lys Thr Ser Met Gly His Asn Ile Val Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met
100 105 110

Asp Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val
115 120 125

Lys Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly
130 135 140

Gly Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly
145 150 155 160

Glu Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn
165 170 175

Gly Lys Val Thr Leu Val Asp
180

- <210> 31
- <211> 150
- <212> PRT
- <213> Vibrio parahaemolyticus
- <400> 31

Met Ser Leu Arg Ile Leu Ala Ala Thr Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

Phe Gly Ala Gln Ala Ser Ala Glu Cys Glu Val Ser Ile Asp Ala Asn
20 25 30

PCT/US05/35758

Asp Met Met Gln Phe Ser Thr Lys Thr Leu Ser Val Pro Ala Thr Cys
35 40 45

Lys Glu Val Thr Leu Thr Leu Asn His Thr Gly Lys Met Pro Ala Gln
50 55 60

Ser Met Gly His Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala
65 70 75 80

Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys
85 90 95

Pro Asp Asp Glu Arg Val Tyr Ala His Thr Lys Val Val Gly Gly Gly
100 105 110

Glu Ser Thr Ser Ile Thr Phe Ser Thr Glu Lys Met Thr Ala Gly Gly
115 120 125

Asp Tyr Ser Phe Phe Cys Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Ile Met Gln
130 135 140

Gly Lys Phe Glu Phe Lys
145 150

- <210> 32
- <211> 129
- <212> PRT
- <213> Bordetella bronchiseptica

<400> 32

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Ala Gly Thr Asp Gln Met Gln Phe Asp
1 5 10 15

Lys Lys Ala Ile Glu Val Ser Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Arg Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile
50 55 60

PCT/USDS/35758

Ala Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Leu Ala His Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ala Lys Leu Ala Ala Gly Asp Asp Tyr Thr Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Val
115 120 125

Asp

<210> 33
<211> 162
<212> PRT
<213> Chloroflexus aurantiacus

<400> 33

Met Lys Ile Thr Leu Arg Met Met Val Leu Ala Val Leu Thr Ala Met
1 5 10 15

Ala Met Val Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser
20 25 30

Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Val Thr Ile Glu Ile Gly Ser
35 40 45

Lys Gly Glu Glu Leu Ala Phe Asp Lys Thr Glu Leu Thr Val Ser Ala
50 55 60

Gly Gln Thr Val Thr Ile Arg Phe Lys Asn Asn Ser Ala Val Gln Gln
65 70 75 80

His Asn Trp Ile Leu Val Lys Gly Gly Glu Ala Glu Ala Ala Asn Ile
85 90 95

Ala Asn Ala Gly Leu Ser Ala Gly Pro Ala Ala Asn Tyr Leu Pro Ala
100 105 110

Asp Lys Ser Asn Ile Ile Ala Glu Ser Pro Leu Ala Asn Gly Asn Glu
115 120 125

PCT/US05/35758

Thr Val Glu Val Thr Phe Thr Ala Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Leu Tyr
130 135 140

Ile Cys Thr Val Pro Gly His Tyr Pro Leu Met Gln Gly Lys Leu Val
145 150 155 160

Val Asn

- <210> 34
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Chloroflexus aurantiacus
- <400> 34

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

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

Thr Ser Leu Ser Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Arg Leu Asp Phe Val
35 40 45

Asn Gln Asn Asn Leu Gly Val Gln His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly
50 55 60

Gly Asp Asp Val Ala Ala Ala Val Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala
65 70 75 80

Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro Asp Thr Pro Asn Ala Leu Ala Trp
85 90 95

Thr Ala Met Leu Asn Ala Gly Glu Ser Gly Ser Val Thr Phe Arg Thr
100 105 110

Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Tyr Ile Cys Thr Phe Pro Gly His Tyr
115 120 125

Leu Ala Gly Met Lys Gly Thr Leu Thr Val Thr Pro
130 135 140

PCT/US05/35758

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> conserved sequence of cupredoxin entry domain

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Asp
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 36

Met Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Ile Ser Ala Ala Val Ile Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala
 20 25 30

Gly Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala
 35 40 45

Asp Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu
 50 55 60

PCT/US05/35758

Ser Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys
65 70 75 80

Ala Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro
85 90 95

Lys Ala Ser Met Gly His Asn Leu Val Ile Ala Lys Ala Glu Asp Met
100 105 110

Asp Gly Val Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val
115 120 125

Lys Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly
130 135 140

Gly Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly
145 150 155 160

Asp Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn
165 170 175

Gly Lys Val Thr Leu Val Asp
180

<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 37

Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 38
<211> 33
<212> PRT
<213> Chloroflexus aurantiacus

<400> 38

His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly Gly Asp Asp Val Ala Ala Val
1 5 10 15

PCT/US05/35758

Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro
20 25 30

Asp

<210> 39
<211> 28
<212> PRT
<213> Bordetella pertussis

<400> 39

Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile Ala
1 5 10 15

Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp
20 25

<210> 40
<211> 27
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

<400> 40

Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met Asp Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly
1 5 10 15

Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 41
<211> 21
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 41

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

Leu Asp Lys Asp Tyr
20

<210> 42
<211> 15

PCT/US05/35758

<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 42

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

<210> 43
<211> 129
<212> PRT
<213> Bordetella pertussis

<400> 43

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Ala Gly Thr Asp Gln Met Gln Phe Asp
1 5 10 15

Lys Lys Ala Ile Glu Val Ser Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Arg Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile
50 55 60

Ala Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Leu Ala His Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ala Lys Leu Ala Ala Gly Asp Asp Tyr Thr Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Val
115 120 125

Asp

<210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

PCT/US05/3575R

<400> 44

Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met Ala Ser
1 5 10 15

Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 45

<211> 27

<212> PRT

<213> Pseudomonas syringae

<400> 45

Ser Lys Lys Ala Asp Ala Ser Ala Ile Thr Thr Asp Gly Met Ser Val
1 5 10 15

Gly Ile Asp Lys Asp Tyr Val Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 46

<211> 27

<212> PRT

<213> Vibrio parahaemolyticus

<400> 46

Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala
1 5 10 15

Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys Pro Asp Asp
20 25

<210> 47

<211> 27

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 47

Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile Ala Ala
1 5 10 15

Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp
20 25

<210> 48

<211> 15

PCT/US05/35753

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> conserved sequence of cupredoxin entry domain

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(6)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

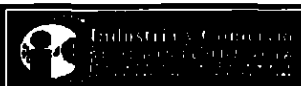
<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 48

Asp	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Lys	Xaa	Xaa	Asp
1				5					10					15



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Empresario Registrado en la Cámara de Comercio de Bogotá

Expediente No		No de unidades	No de Folios
Item			
1	CD		✓
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	2	1
10	OTROS:		

Observaciones:

Cert Final

195

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-043820- -00000-0000

Fecha: 2007-05-03 18:00:22 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Evo: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 195

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 30,142
FECHA : ABRIL 16 DE 2007

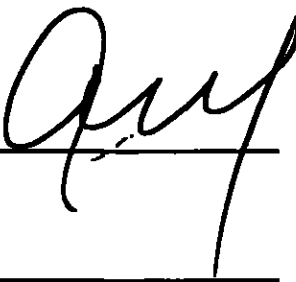
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55800350	16/04/2007	23,650,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	482,000.00

SUN: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 15889 841 001 4



No. 07-043820-00000-0000

Fecha: 2007-05-03 16:00:22

Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTE(YI)

Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 185

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

[x]

MODELO DE UTILIDAD

[]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]
- ◆ Descripción de la invención [x]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.cowww.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	7 43820
	Solicitud internacional	PCT/US2005/035758
	Fecha inicio fase nacional	07/05/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

JUV 8895

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

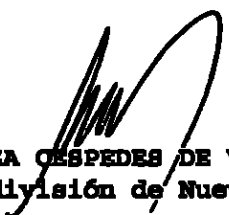
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Radicación No.: 7 43820



ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 27 JUL 2007
adpall