

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 863**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2014 PCT/US2014/033206**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14165853**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2014 E 14779844 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2981279**

54 Título: **Péptidos del inhibidor de MARCKS para la inhibición de metástasis**

30 Prioridad:

05.04.2013 US 201361808966 P

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

30.05.2019

73 Titular/es:

BIOMARCK PHARMACEUTICALS LTD. (50.0%)
4364 South Alston Ave.
Durham, US y
NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

PARIKH, INDU y
ADLER, KENNETH B.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 714 863 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos del inhibidor de MARCKS para la inhibición de metástasis

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a péptidos, para uso en la inhibición de la metástasis de células cancerosas.

10 Descripción del archivo de texto presentado electrónicamente

Los contenidos del archivo de texto enviado electrónicamente se incluyen en este documento como referencia en su totalidad: Una copia en formato legible por ordenador del Listado de Secuencias (nombre de archivo: BMRK_006_01WO_SubSeqList_ST25.txt, fecha registrada: 12 de mayo de 2014, tamaño de archivo 58 kilobytes).

15 Antecedentes de la invención

La proteína MARCKS (Sustrato de quinasa C rica en alanina miristoilada) es un objetivo de fosforilación ubicuo de la proteína quinasa C (PKC) (Li et al., *Journal of Biological Chemistry* 276; 40982 (2002)). La MARCKS tiene tres regiones conservadas evolutivamente (Aderem et al., *Nature* 1988; 332: 362-364; Thelen et al., *Nature* 1991; 351: 320-322; Hartwig et al., *Nature* 1992; 356: 618-622; Seykora et al., *J Biol Chem* 1996; 271: 18797-18802): un terminal N, un dominio de sitio de fosforilación (o PSD; también conocido como dominio efector) y un dominio de homología múltiple 2 (MH2). El terminal N, una secuencia de alfa-aminoácidos que comprende 24 residuos de aminoácidos con una fracción de ácido mirístico unido a través de un enlace amida al residuo de glicina terminal N, está involucrado en la unión de MARCKS a membranas en células (Seykora et al., *J Biol Chem* 1996; 271: 18797-18802) y posiblemente a calmodulina (Matsubara et al., *J Biol Chem* 2003; 278: 48898-48902). Esta secuencia de 24 aminoácidos se conoce como el péptido MANS. El péptido MANS y los péptidos relacionados se divulgan en la patente de EE.UU. Números 7,265,088; 7,529,926; 7,544,772; 8,492,518; 8,501,911; 7,918,293,870; y 8,563,689. Rombouts et al (*Cancer Letters* vol 333, no. 2, 29 January 2013) enseñan que la inhibición de la expresión de MARKS reduce la migración de las células cancerosas de colon humanas in vitro.

30 Subsiste la necesidad en la técnica de terapias nuevas y seguras dirigidas a inhibir la metástasis de células cancerosas. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

35 Breve resumen de la invención.

Se describen en este documento métodos y composiciones útiles para prevenir o tratar cáncer. Se describen métodos y composiciones para inhibir la metástasis de células cancerosas, proliferación de células cancerosas, crecimiento de tumor, o angiogénesis. Se describen métodos y composiciones para prevenir e inhibir la metástasis de células cancerosas, proliferación de células cancerosas, crecimiento de tumor, o angiogénesis, que comprenden la inhibición de sustrato de quinasa C rica en alanina miristoilada (MARCKS). Las composiciones comprenden compuestos inhibidores de MARCKS que incluyen péptidos, polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y moléculas de ácido nucleico tales como polinucleótidos antisentido, aptámeros, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN micro (ARNmi), y ARN de horquilla corta (ARNhc). Las "moléculas de ácido nucleico inhibidoras de MARCKS" como se utiliza en este documento se refieren a polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico tales como ARNip, ARNmi, ARNhc, o polinucleótidos antisentido, que reducen la expresión y/o función de MARCKS. Las composiciones descritas en este documento pueden comprender uno o más péptidos relacionados con MARCKS. Los péptidos relacionados con MARCKS corresponden al dominio MH2 de MARCKS. Los péptidos pueden ser péptidos relacionados con secuencia de terminal N miristoiladas (péptido MANS, que es un fragmento de 24 aminoácidos de MARCKS) (es decir, "péptidos relacionados con MANS"). Los péptidos relacionados con MANS se seleccionan del grupo que consiste de: péptido MANS; fragmentos no sustituidos de MANS que contienen cuatro o más aminoácidos y que comprenden la misma secuencia encontrada en la secuencia de aminoácidos de terminal N en el péptido MANS; los péptidos comprenden una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia encontrada en el péptido MANS o fragmento de péptido MANS; péptido MANS o fragmentos de péptido MANS con la secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica como el péptido MANS que son terminales N miristoilados o terminales N acilados con, por ejemplo, un grupo acetilo; y el péptido MANS o fragmentos de péptido MANS con la secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica como el péptido MANS que se modifican químicamente en el terminal C. Los péptidos relacionados con MANS pueden ser modificados químicamente tanto en el terminal C como en el terminal N. Los compuestos inhibidores de MARCKS descritos en este documento pueden ser anticuerpos o fragmentos de los mismos. El anticuerpo o fragmento del mismo inhibe las funciones de la proteína MARCKS. El anticuerpo o fragmento del mismo se une al terminal N de la proteína MARCKS o la secuencia MH2 de la proteína MARCKS. Encontramos de forma sorprendente que el uso de diferentes tipos de compuestos inhibidores de MARCKS exhibe un efecto inhibidor sobre la migración de células cancerosas in vitro e inhibe la metástasis in vivo. Los compuestos inhibidores de MARCKS exhiben un efecto inhibidor sobre la migración de estirpes celulares cancerosas agresivas. Los compuestos inhibidores de MARCKS descritos en este documento inhiben la metástasis de células cancerosas en un tumor en un mamífero. El tumor puede ser un tumor sólido. El

tumor puede ser un tumor no sólido. Los compuestos inhibidores de MARCKS proporcionados en este documento inhiben la metástasis de células cancerosas asociadas con un linfoma o leucemia.

5 Los compuestos inhibidores de MARCKS pueden comprender polinucleótidos inhibidores de MARCKS o moléculas de ácido nucleico inhibidoras de MARCKS. Los compuestos inhibidores de MARCKS descritos en este documento pueden ser polinucleótidos de ARN antisentido, ARNip, ARNhc, o ARNmico que inhiben la expresión y/o función de MARCKS. Los compuestos inhibidores de MARCKS descritos en este documento pueden ser imitadores de proteínas o polinucleótidos que regulan la Expresión de MARCKS, tales como imitadores de miR21.

10 Los compuestos inhibidores de MARKS descritos en este documento pueden ser péptidos relacionados con MARCKS o relacionados con MANS. Los péptidos relacionados con MARCKS descritos en este documento pueden corresponder al dominio miristoilado de terminal N de MARCKS. Por lo tanto, los péptidos relacionados con MARCKS descritos en este documento pueden ser péptidos relacionados con MANS. Los péptidos relacionados con MANS y ciertos péptidos relacionados con MANS modificados químicamente descritos en este documento pueden
15 bloquear la migración de estirpes celulares cancerosas agresivas. Los péptidos relacionados con MANS descritos en este documento se pueden utilizar para ejercer un efecto inhibitor sobre la metástasis de células cancerosas. Los compuestos inhibidores de MARCKS descritos en este documento pueden exhibir efectos de bloqueo sobre la metástasis de células cancerosas in vivo. Los sitios de inhibición de enfermedad metastásica incluyen por lo menos tejido pulmonar, tejido cardíaco, tejido del bazo, tejido intestinal y tejido del diafragma. Los péptidos relacionados con
20 MANS descritos en este documento se pueden utilizar para tratar o prevenir la metástasis de células cancerosas, proliferación de células cancerosas, crecimiento de células de tumor, o angiogénesis.

Se describen en este documento composiciones y métodos para tratar o prevenir cáncer que comprende la
25 administración de un compuesto inhibidor de MARCKS a una célula cancerosa o a una célula que cumple una función en el desarrollo, mantenimiento, proliferación, o metástasis de células cancerosas. Se describe un método en este documento para inhibir la metástasis de una célula cancerosa que comprende la administración a la célula cancerosa de una cantidad que inhibe la metástasis de un compuesto inhibidor de MARCKS. Se describe un método en este documento para inhibir la metástasis de una célula cancerosa que comprende la administración a la célula cancerosa de una cantidad que inhibe la metástasis de un péptido relacionado con MANS.
30

En un aspecto de la invención se proporciona un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método para inhibir la metástasis de una célula cancerosa, en la que el compuesto inhibidor de MARCKS es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 231 (inclusive), SEQ ID NO: 234, y SEQ ID NO: 235; en la que el aminoácido de terminal N y/o terminal C de la
35 secuencia de péptidos se modifica químicamente.

Se describe en este documento un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido relacionado con MANS. También descrito en este documento se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del
40 mismo, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 231 (inclusive), SEQ ID NO: 234, y SEQ ID NO: 235; en la que el aminoácido de terminal N y/o terminal C de la secuencia de péptidos opcionalmente se modifica químicamente.

45 En una realización de la presente invención, el aminoácido de terminal N del péptido se modifica químicamente mediante la acilación del aminoácido de terminal N del péptido en la forma de una amida seleccionada del grupo que consiste de:

- 50 • una amida de un ácido carboxílico C₂ (acetil) a C₂₄ alifático que puede ser lineal, ramificada, saturada, o insaturada,
- una amida de ácido trifluoroacético,
- una amida de ácido benzoico, y
- una amida de un ácido alquil sulfónico alifático C₁ a C₂₄; o
- el grupo amina de terminal N del aminoácido de terminal N del péptido se puede alquilar con un grupo seleccionado del grupo que consiste de:
- 55 • un grupo alquilo C₁ a C₂₄ alifático,
- un grupo 2-(alquilo C₁ a C₂₄ alifático)oxietilo lineal,
- un grupo omega-metoxi-poli(etilenooxi)n-etilo, en el que n es desde 0 hasta 10.

60 En una realización adicional de la presente invención, la amida de terminal N se selecciona del grupo que consiste de acetilo y miristoilo.

En otra realización de la presente invención, el aminoácido de terminal C del péptido se modifica químicamente mediante la formación de amida en el grupo de ácido carboxílico de terminal C del aminoácido de terminal C del péptido en la forma de una amida seleccionada del grupo que consiste de:

- 65 • una amida de amoniaco,

- una amida de una alquil amina C₁ a C₂₄ alifática,
- una amida de una alquil amina C₂ a C₂₄ alifática sustituida con hidroxilo,
- una amida de un grupo (alquilo C₁ a C₂₄ alifático)oxietilamina lineal, y
- una amida de un grupo omega-metoxi-poli(etilenooxi)n-etilamina, en el que n es desde 0 hasta 10.

En una realización de la presente invención, el péptido se selecciona del grupo que consiste de N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV (SEQ ID No: 2); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAA (SEQ ID No: 4); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEA (SEQ ID No: 7); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEQ ID No: 11); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEQ ID No: 16); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERP (SEQ ID No: 22); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAER (SEQ ID No: 29); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEQ ID No: 37); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAA (SEQ ID No: 46); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAA (SEQ ID No: 56); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEA (SEQ ID No: 67); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEE (SEQ ID No: 79); N-miristoil-GAQFSKTAAKG (SEQ ID No: 92); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106); N-miristoil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121); N-miristoil-GAQFSKTA (SEQ ID No: 137); N-miristoil-GAQFSKT (SEQ ID No: 154); N-miristoil-GAQFSK (SEQ ID No: 172), N-miristoil-GAQFS (SEQ ID No: 191), N-miristoil-GAQF (SEQ ID No: 211), N-acetil-RGAQFSKTAAK (SEQ ID No: 234), N-acetil-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 234), N-acetil-RAKGE (SEQ ID NO: 235), y una combinación de los mismos.

En una realización, el péptido se selecciona del grupo que consiste de N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106); N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219); N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106); N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 121); y N-acetil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106). En una realización, ciertos aminoácidos están presentes en la configuración d. Por ejemplo, en una realización, el péptido es N-acetil-GAQFS(d)KTAA(d)K (SEQ ID NO: 106), en el que la lisina (K) en las posiciones 6 y 10 del péptido son de configuración d.

Los péptidos relacionados con MANS exhiben propiedades que los hacen adecuados para uso en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, en una realización, ciertos péptidos relacionados con MANS divulgados en este documento exhiben solubilidad mejorada en relación con el péptido o péptidos MANS diferentes de los péptidos relacionados con MANS. En otra realización, ciertos péptidos relacionados con MANS proporcionados en este documento exhiben vidas medias más largas en plasma que el péptido o péptidos MANS diferentes de los péptidos relacionados con MANS.

El péptido relacionado con MARCKS exhibe migración reducida de células cancerosas. Por ejemplo, en una realización, el tratamiento previo de células cancerosas con un péptido relacionado con MANS (por ejemplo, N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106); N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219); N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106); N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 121); y N-acetil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106)) puede reducir la migración de las células cancerosas cuando las células se pretratan con desde aproximadamente 10 µm de péptido hasta aproximadamente 200 µm de péptido; o se pretratan con desde aproximadamente 20 µm hasta aproximadamente 200 µm; o se pretratan con desde aproximadamente 25 µm de péptido hasta aproximadamente 75 µm de péptido. En una realización, el péptido relacionado con MARCKS exhibe migración reducida de células cancerosas cuando se administra a concentraciones de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 500 µM, aproximadamente 5 µM a aproximadamente 250 µM, o aproximadamente 10 µM a aproximadamente 200 µM. En una realización, el péptido relacionado con MARCKS exhibe migración reducida de células cancerosas cuando se administra a concentraciones de aproximadamente 1 µM, aproximadamente 5 µM, aproximadamente 10 µM, aproximadamente 25 µM, aproximadamente 50 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 150 µM, aproximadamente 200 µM, o aproximadamente 500 µM. En una realización, las células cancerosas se tratan con el péptido in vitro para determinar los efectos del péptido. En una realización, las células cancerosas se derivan de un paciente. En una realización adicional, las células cancerosas se tratan con el péptido in vitro para determinar si el paciente es probable que responda al tratamiento con el péptido.

En una realización, el péptido relacionado con MARCKS exhibe metástasis reducida de células cancerosas cuando se administra a un paciente a concentraciones de aproximadamente 0.01 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día. En una realización adicional, el péptido relacionado con MARCKS exhibe metástasis reducida de células cancerosas cuando se administra a un paciente a concentraciones de aproximadamente 0.1 mg/kg/día a aproximadamente 5.0 mg/kg/día. En aún una realización adicional, el péptido relacionado con MARCKS exhibe metástasis reducida de células cancerosas cuando se administra a un paciente a concentraciones de aproximadamente 0.5 mg/kg/día a aproximadamente 2.5 mg/kg/día. Por ejemplo, el péptido relacionado con MARCKS exhibe migración reducida de células cancerosas cuando se administra a un paciente a concentraciones de aproximadamente 0.01, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.75, aproximadamente 1.0, aproximadamente 1.25, aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.75, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.25, aproximadamente 2.5, aproximadamente 2.75, aproximadamente 3.0, aproximadamente 3.5, aproximadamente 4.0, aproximadamente 5.0, aproximadamente 6.0, aproximadamente 7.0, aproximadamente 8.0, aproximadamente 9.0, aproximadamente 10.0, o más mg/kg/día.

En una realización, el péptido se administra mediante inhalación de una solución o suspensión líquida, o mediante inhalación de una formulación de polvo seco del péptido. En otra realización, el péptido se administra mediante inyección de una formulación o suspensión líquida del péptido. En una realización adicional, la inyección está en una región de tumor primaria, en la que la región contiene la célula cancerosa. En una realización adicional, la célula cancerosa reside en un tumor en un mamífero. En una realización, el tumor es un tumor sólido. En otra realización, el tumor es un tumor no sólido. En una realización, los compuestos inhibidores de MARCKS proporcionados en este documento inhiben la metástasis de células cancerosas asociadas con un linfoma o leucemia. En otra realización, la formulación líquida es isotónica. En otra realización, la formulación líquida es tamponada.

En una realización, la cantidad que inhibe metástasis del péptido está en el rango desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 100 micromoles por mililitro. En una realización adicional, la cantidad que inhibe metástasis del péptido está en el rango desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 micromoles por mililitro. En otra realización, el péptido está en una formulación que comprende un fármaco adicional útil en el tratamiento de cáncer, o se formula para administración con un fármaco adicional.

Se describe en este documento un método para tratar o prevenir cáncer o inhibir metástasis de una célula cancerosa en un mamífero, en la que el método comprende administrar a dicho mamífero un compuesto inhibidor de MARCKS. El compuesto inhibidor de MARCKS puede ser un polinucleótido o molécula de ácido nucleico que reduce la expresión o actividad de MARCKS. El polinucleótido inhibidor de MARCKS puede ser un ARN antisentido, ARNip, ARNhc, o ARNmi. El polinucleótido inhibidor de MARCKS se puede administrar en una cantidad desde aproximadamente 10 nM hasta 10 μ M, o desde aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 500 nM, o desde aproximadamente 30 nM hasta aproximadamente 300 nM, o desde aproximadamente 40 nM hasta aproximadamente 200 nM, o desde aproximadamente 50 nM hasta aproximadamente 100 nM. El polinucleótido inhibidor de MARCKS puede ser un imitador de un ARNmi que regula la expresión de MARCKS. Por ejemplo, el polinucleótido inhibidor de MARCKS es un imitador de miR21. Los polinucleótidos y moléculas de ácido nucleico se pueden administrar juntos con un agente de suministro tal como un péptido, proteína, lípido, esteroide, polímero, reactivo de transfección, o cualquier agente de suministro de polinucleótido o ácido nucleico conocido en la técnica.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido para uso en un método para inhibir la metástasis de una célula cancerosa en un mamífero, en la que el método comprende administrar a dicho mamífero un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, y SEQ ID NO: 235; en la que el aminoácido de terminal N y/o terminal C de la secuencia de péptidos se modifica químicamente, y en la que dicho péptido exhibe un índice de migración de por lo menos aproximadamente 2.0 luego del tratamiento previo de células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con una concentración de 100 μ mol de dicho péptido y un periodo de migración de 12 horas. El péptido puede exhibir un índice de migración de por lo menos aproximadamente 1.5, por lo menos aproximadamente 1.6, por lo menos aproximadamente 1.7, por lo menos aproximadamente 1.8, por lo menos aproximadamente 1.9, por lo menos aproximadamente 2.0, por lo menos aproximadamente 2.1, por lo menos aproximadamente 2.2, por lo menos aproximadamente 2.3, por lo menos aproximadamente 2.4, por lo menos aproximadamente 2.5, por lo menos aproximadamente 2.6, por lo menos aproximadamente 2.7, por lo menos aproximadamente 2.8 por lo menos aproximadamente 2.9, por lo menos aproximadamente 3.0, o más, luego del tratamiento previo de células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En una realización adicional, el péptido relacionado con MANS está presente en una concentración de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, o 200 μ molar de dicho péptido. En otra realización, el periodo de migración es de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 15, 20, 21, 22, 23, o 24 horas. En una realización, el péptido relacionado con MANS exhibe un índice de migración de por lo menos aproximadamente 1.5 luego del tratamiento previo de células NSCLC con una concentración de 50 μ molar de dicho péptido y un periodo de migración de aproximadamente 12 horas. En otra realización, el péptido relacionado con MANS exhibe un índice de migración de por lo menos aproximadamente 2.0 luego del tratamiento previo de células NSCLC con una concentración de por lo menos aproximadamente 100 μ molar de dicho péptido y un periodo de migración de aproximadamente 12 horas.

El péptido se puede administrar al sujeto en una dosis de aproximadamente 0.01 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día. El péptido relacionado con MANS se puede administrar a concentraciones de aproximadamente 0.1 mg/kg/día a aproximadamente 5.0 mg/kg/día. En aún una realización adicional, el péptido relacionado con MANS se puede administrar a concentraciones de aproximadamente 0.5 mg/kg/día a aproximadamente 2.5 mg/kg/día. Por ejemplo, el péptido relacionado con MANS se administra en una dosis de aproximadamente 0.01, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.75, aproximadamente 1.0, aproximadamente 1.25, aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.75, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.25, aproximadamente 2.5, aproximadamente 2.75, aproximadamente 3.0, aproximadamente 3.5, aproximadamente 4.0, aproximadamente 5.0, aproximadamente 6.0, aproximadamente 7.0, aproximadamente 8.0, aproximadamente 9.0, aproximadamente 10.0, o más mg/kg/día para el tratamiento o prevención de cáncer que incluye inhibir la metástasis de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta un campo de recuento de células de un control negativo después de un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 2A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido MANS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

5 La Figura 2B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido MANS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 3A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido RNS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

10 La Figura 3B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido RNS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 4A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoil- GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No: 106) seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

15 La Figura 4B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoil- GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No: 106) seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 5A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido relacionado con MANS SEQ ID NO: 121) seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

20 La Figura 5B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido relacionado con MANS SEQ ID NO: 121) seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 6A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219) seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

25 La Figura 6B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219) seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 7A presenta gráficamente los números de células migradas obtenidos 12 horas después del tratamiento previo a 50 μ molar con el péptido MANS, N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121), N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219), o péptido RNS, o sin péptido (control).

30 La Figura 7B presenta gráficamente los números de células migradas obtenidos 12 horas después del tratamiento previo a 100 μ molar con el péptido MANS, N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121), N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219), o péptido RNS, o sin péptido (control).

La Figura 8A presenta gráficamente el índice de migración de células de la estirpe celular del NSCLC humano agresivo, en el que un valor alto del índice de migración significa menor migración después del tratamiento previo con los péptidos de la invención a 50 μ molar seguido por 12 horas de tratamiento de acuerdo con el protocolo.

35 La Figura 8B presenta gráficamente el índice de migración de células de la estirpe celular del NSCLC humano agresivo, en el que un valor alto del índice de migración significa menor migración después del tratamiento previo con los péptidos de la invención a 100 μ molar seguido por 12 horas de tratamiento de acuerdo con el protocolo.

40 La Figura 9 presenta gráficamente los números de células respectivos (panel izquierdo) y el número de índice de migración (panel derecho) para MANS, RNS, N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), o N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), o control (sin péptido) en experimentos utilizando 50 μ molar del péptido indicado y la estirpe celular NSCLC humana agresiva.

45 La Figura 10 presenta gráficamente los números de células respectivos (panel izquierdo) y el número de índice de migración (panel derecho) para MANS, RNS, N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219), o control (sin péptido) en experimentos utilizando 100 μ molar del péptido indicado y la estirpe celular NSCLC humana agresiva.

50 La Figura 11 muestra los números de células migradas 12 horas después del tratamiento previo de células A549 sin péptido o con el péptido de prueba indicado (MANS, RNS, N-acetil-GAQFSKTAAK, N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), N-miristoil- GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No: 106, N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219), o N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121)) a 10 μ molar (panel izquierdo superior), 25 μ molar (panel derecho superior) o 50 μ molar (panel inferior) de péptido.

55 La Figura 12 muestra el número promedio de tumores por ratón en el pulmón izquierdo, pulmón derecho, corazón, y diafragma en animales tratados con N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106). N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (100 μ M en PBS) se administró una vez al día durante 22 días, iniciando a los 3 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa, a través inyección intraperitoneal (50 μ L) o inhalación (30 mins, Sistema de Suministro de Nebulizador, Aeroneb Lab).

60 La Figura 13 muestra el número promedio de tumores por ratón en el pulmón izquierdo, pulmón derecho, corazón, y diafragma en ratones a los que se administra N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (100 μ m en PBS) mediante inhalación utilizando un Sistema de Suministro de Nebulizador (Aeroneb Lab) durante 30 días, una vez al día iniciando en el Día 15 o en el Día 4 en relación con la inyección de células de adenocarcinoma humano (PC-9).

La Figura 14 muestra el número total de tumores en ratones a los que se administra N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (100 μ M en PBS) mediante inhalación utilizando un Sistema de Suministro de Nebulizador (Aeroneb Lab) durante 30 días, una vez al día iniciando en el Día 15 o en el Día 4 con relación a la inyección de células PC-9.

65 La Figura 15 representa el número de nódulos metastásicos encontrados en ratones tratados cada dos días con control de vehículo, N-acetil-GAQFSKTAAK aerosolizado (SEQ ID No: 106) iniciando en el Día -1 o día +3 con relación a la inyección de células cancerosas A549, o MANS aerolizado iniciando en el Día -1 o día +3 con relación a

la inyección de células cancerosas A549. Los péptidos aerolizados (100 μ M en PBS) se administraron mediante inhalación utilizando el Sistema de Suministro de Nebulizador (Aeroneb Lab). *, $p < 0.05$, estadísticamente significativo en comparación con el grupo control; a, estadísticamente no significativo en comparación entre los grupos.

5 La Figura 16 muestra el nivel de proteína MARCKS luego de la administración de ARNip de MARCKS de 100 nM o ARNip de control en células PC9.

La Figura 17 muestra el nivel de proteína MARCKS luego de la administración de ARNip de MARCKS de 100 nM o ARNip de control en células A549.

10 La Figura 18 muestra la migración de células cancerosas PC9 luego de tratamiento con ARNip de MARCKS de 100 nM o ARNip de control.

La Figura 19 muestra la migración de A549 células cancerosas luego de tratamiento con ARNip de MARCKS de 100 nM o ARNip de control.

La Figura 20 muestra la expresión de MARCKS en células PC9 mediante Western Blot luego de tratamiento con control negativo 50 nM (vehículo HiPerfect; carril A) o inhibidor de miR21 50 nM (carril B).

15 La Figura 21 muestra la migración de células cancerosas PC9 luego de inhibición de miR21 (inhibidor de mir-21 50 nM o 100 nM) o activación de miR21 (imitador de miR-21 50 nM o 100 nM).

Descripción detallada de la invención

20 La proteína del sustrato de quinasa C rica en alanina miristoilada (MARCKS) ha sido implicada previamente en múltiples procesos celulares. Por ejemplo, se ha mostrado que la proteína MARCKS está involucrada integralmente en la secreción celular, desgranulación, migración y expresión génica. Estos estudios se basaron en la capacidad de un péptido idéntico a la secuencia de terminal N miristoilada de la proteína MARCKS (es decir, péptido MANS) para afectar los procesos en diferentes tipos de células cuando las células se trataron previamente con el péptido MANS antes de estimulación. En todos estos casos, un péptido de control de sentido erróneo (que consiste en una secuencia de aminoácidos aleatoria de los aminoácidos del péptido MANS, y que se denomina en este documento como el péptido RNS) no tuvo efecto en relación con la actividad mostrada por el péptido MANS.

30 En una realización, las composiciones comprenden compuestos inhibidores de MARCKS tales como cualquier tipo de compuesto inhibidor conocido en la técnica que incluye péptidos, polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico, tales como polinucleótidos antisentido, aptámeros, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN micro (ARNmi), y ARN de horquilla corta (ARNhc). En una realización, las composiciones comprenden uno o más péptidos relacionados con el sustrato de quinasa C enriquecido con alanina miristoilada (MARCKS). En otra realización, los péptidos relacionados con MARCKS corresponden al dominio MH2 de MARCKS. En otra realización, las composiciones comprenden péptidos inhibidores de MARCKS, que incluyen péptidos que corresponden a la secuencia de terminal N.

40 En una realización, el compuesto inhibidor de MARCKS proporcionado en este documento es un anticuerpo. Como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína de unión que tiene por lo menos un dominio de unión a antígeno e incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos y/o variantes de anticuerpo, que incluyen polipéptidos recombinantes, proteínas de fusión, e inmunocombinados. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, el fragmento Fab, el fragmento Fc, el fragmento Fv, el fragmento dAb, regiones de CDR aisladas, $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos, y moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv). El experto reconocerá que los anticuerpos o fragmentos proporcionados en este documento se pueden generar a partir de cualesquier especies que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, primate, llama y humano. El experto reconocerá adicionalmente que los anticuerpos o fragmentos proporcionados en el presente documento pueden ser quiméricos, humanizados o completamente humanos.

50 Se proporcionan composiciones y métodos para tratar o prevenir cáncer. Los métodos para tratar o prevenir cáncer divulgados en este documento incluyen tratar o prevenir todos los aspectos del cáncer que incluyen, pero no se limitan a, metástasis, crecimiento de tumor, proliferación de células cancerosas, y angiogénesis. Se describen composiciones y métodos para tratar o prevenir cáncer que comprenden la administración de un compuesto inhibidor de MARCKS a una célula cancerosa o a una célula que cumple una función en el desarrollo, mantenimiento, proliferación, o metástasis de células cancerosas, tales como, por ejemplo, una célula endotelial.

60 En un aspecto, se proporcionan composiciones para inhibir la metástasis de células cancerosas, en las que el método comprende administrar compuestos inhibidores de MARCKS. En una realización, los compuestos inhibidores de MARCKS son péptidos inhibidores de MARCKS. También se describen los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a MARCKS o péptidos de MARCKS, o polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico que incluyen polinucleótidos antisentido, aptámeros, ARNip, ARNmi, y ARNhc que inhiben las funciones de la proteína MARCKS. En una realización adicional de la invención, los péptidos son péptidos relacionados con MANS, en los que los péptidos inhiben la metástasis de células cancerosas. En una realización, se proporcionan los péptidos inhibidores de MARCKS que inhiben la metástasis de células cancerosas. Se describen métodos para tratar cánceres utilizando las composiciones divulgadas en este documento. Los métodos proporcionados pueden comprender poner en contacto una célula cancerosa con un péptido inhibidor de MARCKS. La célula cancerosa

puede estar presente en un tumor. El péptido inhibidor de MARCKS puede ser un péptido relacionado con MANS. Como se utiliza en este documento, el término "péptido relacionado con MANS" se refiere a un péptido MANS o un péptido sustancialmente idéntico a MANS; o un fragmento de péptido MANS que contiene por lo menos cuatro aminoácidos contiguos encontrados en el péptido MANS, o es sustancialmente idéntico a un péptido que contiene por lo menos 4 aminoácidos contiguos encontrados en el péptido MANS. Por lo tanto, los péptidos relacionados con MANS son desde 4 hasta 24 aminoácidos en longitud. Como se utiliza en este documento, el término "sustancialmente idéntico" significa, con respecto a la comparación de las secuencias de aminoácidos de dos péptidos o comparación de las secuencias de aminoácidos de dos segmentos de péptido (por ejemplo, segmentos de una secuencia de aminoácidos de péptido de referencia), que la secuencia de aminoácidos de los péptidos o segmentos de péptidos tienen por lo menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, por lo menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, o por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de los péptidos tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia al péptido MANS o el fragmento de péptido MANS. En una realización, el péptido relacionado con MANS puede comprender un péptido desde 4 hasta 24 aminoácidos en longitud que es idéntico a o sustancialmente idéntico al péptido MANS y puede comprender adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales. Por ejemplo, en una realización, el péptido relacionado con MANS comprende desde 4 hasta 24 aminoácidos contiguos idénticos a o sustancialmente idénticos al péptido MANS y adicionalmente comprende por lo menos un aminoácido de terminal N que no está presente en el péptido MANS tal como, por ejemplo, arginina.

En una realización, el péptido inhibidor de MARCKS se modifica químicamente. En una realización, el péptido inhibidor de MARCKS es un péptido relacionado con MANS que se acila en la posición de terminal N. En una realización adicional, el péptido relacionado con MANS se acila con un grupo acetilo en la posición de terminal N. En otra realización, el péptido relacionado con MANS se miristoila en la posición de terminal N. En otra realización, el péptido relacionado con MANS se modifica químicamente en la posición de terminal C. En una realización adicional, el péptido relacionado con MANS se modifica químicamente en la posición de terminal C mediante formación de una amida con una amina (por ejemplo, amoniaco). En otra realización, el péptido relacionado con MANS se modifica químicamente en la posición de terminal N y terminal C. La Tabla 1 enumera los péptidos relevantes para la invención actual que se miristoilan en su posición de terminal N, pero no se sustituyen en su posición de terminal C. Ciertos péptidos de control (péptidos RNS) se enumeran en las Tablas 1 y 2, y se miristoilan. Sin embargo, los péptidos RNS no se considera que residen dentro del alcance de la invención actual.

Tabla 1. Péptidos relacionados con MANS de la invención que se miristoilan en el terminal N y que se pueden modificar químicamente en la posición del terminal C como se describe aquí

Péptido No.	Secuencias de aminoácido de N-miristoilo	SEQ ID No:	
péptido 1	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 1	MANS
péptido 2	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 2	
péptido 4	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 4	
péptido 7	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO: 7	
péptido 11	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 11	
péptido 16	GAQFSKTAAKGEAAAERPG	SEQ ID NO: 16	
péptido 22	GAQFSKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO: 22	
péptido 29	GAQFSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO: 29	
péptido 37	GAQFSKTAAKGEAAA	SEQ ID NO: 37	
péptido 46	GAQFSKTAAKGEAAA	SEQ ID NO: 46	
péptido 56	GAQFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO: 56	
péptido 67	GAQFSKTAAKGEA	SEQ ID NO: 67	
péptido 79	GAQFSKTAAKGE	SEQ ID NO: 79	
péptido 92	GAQFSKTAAKG	SEQ ID NO: 92	
péptido 106	GAQFSKTAAK	SEQ ID NO: 106	
péptido 121	GAQFSKTAA	SEQ ID NO: 121	
péptido 137	GAQFSKTA	SEQ ID NO: 137	
péptido 154	GAQFSKT	SEQ ID NO: 154	
péptido 172	GAQFSK	SEQ ID NO: 172	
péptido 191	GAQFS	SEQ ID NO: 191	
péptido 211	GAQF	SEQ ID NO: 211	
Péptido 232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	SEQ ID NO: 232	RNS

La Tabla 2 enumera péptidos relacionados con fragmentos de MANS de la invención, que se pueden sustituir o modificar químicamente en la posición de terminal N y/o terminal C. En una realización, estos fragmentos activos del péptido MANS se pueden miristoilar en la posición de terminal N como aquellas en la Tabla 1. En otra realización, la modificación química en la posición de terminal C comprende amidación, por ejemplo, formación de una amida con una amina, tal como, por ejemplo, amoniaco. El péptido 234 (SEQ ID NO: 234) es un homólogo de péptido sustituido

5 con arginina en el terminal N del péptido 106 (SEQ ID NO: 106; RGAQFSKTAAK), que se puede modificar químicamente en el terminal N (por ejemplo, análogo de acetilo de terminal N, Ac- RGAQFSKTAAK), y que también se puede modificar químicamente en su terminal N y su terminal C (por ejemplo, acetil- de terminal N, amida de terminal C con el análogo de amoniaco, Ac-RGAQFSKTAAK-NH2). El péptido 235 (SEQ ID NO: 235) es un homólogo de péptido sustituido con arginina de terminal N del péptido 219, (SEQ ID NO: 219; RAKGE) que se puede modificar químicamente en el terminal N (por ejemplo, análogo de acetilo de terminal N, Ac-RAKGE), y que también se puede modificar químicamente en su terminal N y su terminal C (por ejemplo, acetil- terminal N, -amina de terminal C con análogo de amoniaco, Ac-RAKGE-NH2). Las modificaciones o sustituciones de terminal N preferidos Las modificaciones o sustituciones de terminal N preferidos incluyen grupos miristoilo y acetilo, así como también grupos arginina de terminal N, grupos acetil-arginina de terminal N, y grupos miristoil-arginina de terminal N. La modificación de terminal C preferida incluye el grupo amida de amoniaco.

15 Tabla 2. Secuencias de péptido relacionado con MARCKS que se puede modificar químicamente en la posición de terminal N y/o terminal C como se describe en este documento

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 1	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 1	MANS
péptido 2	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 2	
péptido 3	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 3	
péptido 4	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 4	
péptido 5	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 5	
péptido 6	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 6	
péptido 7	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO: 7	
péptido 8	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 8	
péptido 9	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 9	
péptido 10	FSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 10	
péptido 11	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 11	
péptido 12	AQFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO: 12	
péptido 13	QFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 13	
péptido 14	FSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 14	
péptido 15	SKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 15	
péptido 16	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 16	
péptido 17	AQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 17	
péptido 18	QFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO: 18	
péptido 19	FSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 19	
péptido 20	SKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 20	
péptido 21	KTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 21	
péptido 22	GAQFSKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO: 22	
péptido 23	AQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 23	
péptido 24	QFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 24	
péptido 25	FSKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO: 25	
péptido 26	SKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 26	
péptido 27	KTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 27	
péptido 28	TAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 28	
péptido 29	GAQFSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO: 29	
péptido 30	AQFSKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO: 30	
péptido 31	QFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 31	
péptido 32	FSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO: 32	
péptido 33	SKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO: 33	
péptido 34	KTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO: 34	
péptido 35	TAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 35	

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 36	AAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 36	
péptido 37	GAQFSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO: 37	
péptido 38	AQFSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO: 38	
péptido 39	QFSKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO: 39	

péptido 40	FSKTAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO: 40	
péptido 41	SKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 41	
péptido 42	KTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO: 42	
péptido 43	TAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO: 43	
péptido 44	AAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 44	
péptido 45	AKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 45	
péptido 46	GAQFSKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO: 46	
péptido 47	AQFSKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 47	
péptido 48	QFSKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO: 48	
péptido 49	FSKTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO: 49	
péptido 50	SKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 50	
péptido 51	KTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 51	
péptido 52	TAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO: 52	
péptido 53	AAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO: 53	
péptido 54	AKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 54	
péptido 55	KGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 55	
péptido 56	GAQFSKTAAKGEEAA	SEQ ID NO: 56	
péptido 57	AQFSKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO: 57	
péptido 58	QFSKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 58	
péptido 59	FSKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO: 59	
péptido 60	SKTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO: 60	
péptido 61	KTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 61	
péptido 62	TAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 62	
péptido 63	AAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO: 63	
péptido 64	AKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO: 64	
péptido 65	KGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 65	
péptido 66	GEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 66	
péptido 67	GAQFSKTAAKGEEA	SEQ ID NO: 67	
péptido 68	AQFSKTAAKGEEAA	SEQ ID NO: 68	
péptido 69	QFSKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO: 69	
péptido 70	FSKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 70	
péptido 71	SKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO: 71	

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 72	KTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO: 72	
péptido 73	TAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 73	
péptido 74	AAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO: 74	
péptido 75	AKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO: 75	
péptido 76	KGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 76	
péptido 77	GEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 77	
péptido 78	GAQFSKTAAKGE	SEQ ID NO: 78	
péptido 79	AQFSKTAAKGEEA	SEQ ID NO: 79	
péptido 80	QFSKTAAKGEEAA	SEQ ID NO: 80	
péptido 81	FSKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO: 81	
péptido 82	SKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 82	
péptido 83	KTAAKGEEAAER	SEQ ID NO: 83	
péptido 84	TAAKGEEAAERP	SEQ ID NO: 84	
péptido 85	AAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 85	
péptido 86	AKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO: 86	
péptido 87	KGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO: 87	
péptido 88	GEAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 88	
péptido 89	EAAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 89	
péptido 90	GAQFSKTAAKG	SEQ ID NO: 90	
péptido 91	AQFSKTAAKGE	SEQ ID NO: 91	
péptido 92	QFSKTAAKGEEA	SEQ ID NO: 92	
péptido 93	FSKTAAKGEEAA	SEQ ID NO: 93	
péptido 94	SKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 94	
péptido 95	KTAAKGEEAAER	SEQ ID NO: 95	
péptido 96	TAAKGEEAAERP	SEQ ID NO: 96	

péptido 97	KTAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 97	
péptido 98	TAAKGEEAAER	SEQ ID NO: 98	
péptido 99	AAKGEEAAERP	SEQ ID NO: 99	
péptido 100	AKGEEAAERPG	SEQ ID NO: 100	
péptido 101	KGEEAAERPGE	SEQ ID NO: 101	
péptido 102	GEEAAERPGEA	SEQ ID NO: 102	
péptido 103	EAAERPGEAA	SEQ ID NO: 103	

Tabla 2	péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 104	AAAERPGEAAV	SEQ ID NO: 104	
péptido 105	AAERPGEAAVA	SEQ ID NO: 105	
péptido 106	GAQFSKTAAK	SEQ ID NO: 106	
péptido 107	AQFSKTAAKG	SEQ ID NO: 107	
péptido 108	QFSKTAAKGE	SEQ ID NO: 108	
péptido 109	FSKTAAKGEA	SEQ ID NO: 109	
péptido 110	SKTAAKGEAA	SEQ ID NO: 110	
péptido 111	KTAAKGEEAAA	SEQ ID NO: 111	
péptido 112	TAAKGEEAAE	SEQ ID NO: 112	
péptido 113	AAKGEEAAER	SEQ ID NO: 113	
péptido 114	AKGEEAAERP	SEQ ID NO: 114	
péptido 115	KGEEAAERPG	SEQ ID NO: 115	
péptido 116	GEEAAERPGE	SEQ ID NO: 116	
péptido 117	EAAERPGEA	SEQ ID NO: 117	
péptido 118	AAAERPGEAA	SEQ ID NO: 118	
péptido 119	AAERPGEAAV	SEQ ID NO: 119	
péptido 120	AERPGEAAVA	SEQ ID NO: 120	
péptido 121	GAQFSKTAA	SEQ ID NO: 121	
péptido 122	AQFSKTAAK	SEQ ID NO: 122	
péptido 123	QFSKTAAKG	SEQ ID NO: 123	
péptido 124	FSKTAAKGE	SEQ ID NO: 124	

Tabla 2	péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 125	SKTAAKGEA	SEQ ID NO: 125	
péptido 126	KTAAKGEEAA	SEQ ID NO: 126	
péptido 127	TAAKGEEAAA	SEQ ID NO: 127	
péptido 128	AAKGEEAAE	SEQ ID NO: 128	
péptido 129	AKGEEAAER	SEQ ID NO: 129	
péptido 130	KGEEAAERP	SEQ ID NO: 130	
péptido 131	GEEAAERPG	SEQ ID NO: 131	
péptido 132	EAAERPGE	SEQ ID NO: 132	
péptido 133	AAAERPGEA	SEQ ID NO: 133	
péptido 134	AAERPGEAA	SEQ ID NO: 134	
péptido 135	AERPGEAAV	SEQ ID NO: 135	
péptido 136	ERPGEAAVA	SEQ ID NO: 136	
péptido 137	GAQFSKTA	SEQ ID NO: 137	
péptido 138	AQFSKTAA	SEQ ID NO: 138	
péptido 139	QFSKTAAK	SEQ ID NO: 139	
péptido 140	FSKTAAKG	SEQ ID NO: 140	
péptido 141	SKTAAKGE	SEQ ID NO: 141	
péptido 142	KTAAKGEEA	SEQ ID NO: 142	
péptido 143	TAAKGEAA	SEQ ID NO: 143	
péptido 144	AAKGEEAAA	SEQ ID NO: 144	
péptido 145	AKGEEAAE	SEQ ID NO: 145	

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	

ES 2 714 863 T3

péptido 146	KGEEAAER	SEQ ID NO: 146	
péptido 147	GEAAAERP	SEQ ID NO: 147	
péptido 148	EAAAERPG	SEQ ID NO: 148	
péptido 149	AAAERPGE	SEQ ID NO: 149	
péptido 150	AAERPGEA	SEQ ID NO: 150	
péptido 151	AERPGEAA	SEQ ID NO: 151	
péptido 152	ERPGEAAV	SEQ ID NO: 152	
péptido 153	RPGEAAVA	SEQ ID NO: 153	
péptido 154	GAQFSKT	SEQ ID NO: 154	
péptido 155	AQFSKTA	SEQ ID NO: 155	
péptido 156	QFSKTAA	SEQ ID NO: 156	
péptido 157	FSKTAAK	SEQ ID NO: 157	
péptido 158	SKTAAKG	SEQ ID NO: 158	
péptido 159	KTAAKGE	SEQ ID NO: 159	
péptido 160	TAAKGEA	SEQ ID NO: 160	
péptido 161	AAKGEEA	SEQ ID NO: 161	
péptido 162	AKGEEAA	SEQ ID NO: 162	
péptido 163	KGEEAAE	SEQ ID NO: 163	
péptido 164	GEAAAER	SEQ ID NO: 164	
péptido 165	EAAAERP	SEQ ID NO: 165	
péptido 166	AAAERPG	SEQ ID NO: 166	

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 167	AAERPGE	SEQ ID NO: 167	
péptido 168	AERPGEA	SEQ ID NO: 168	
péptido 169	ERPGEAA	SEQ ID NO: 169	
péptido 170	RPGEAAV	SEQ ID NO: 170	
péptido 171	PGEEAAVA	SEQ ID NO: 171	
péptido 172	GAQFSK	SEQ ID NO: 172	
péptido 173	AQFSKT	SEQ ID NO: 173	
péptido 174	QFSKTA	SEQ ID NO: 174	
péptido 175	FSKTAA	SEQ ID NO: 175	
péptido 176	SKTAAK	SEQ ID NO: 176	
péptido 177	KTAAKG	SEQ ID NO: 177	
péptido 178	TAAKGE	SEQ ID NO: 178	
péptido 179	AAKGEEA	SEQ ID NO: 179	
péptido 180	AKGEEAA	SEQ ID NO: 180	
péptido 181	KGEEAAA	SEQ ID NO: 181	
péptido 182	GEAAAE	SEQ ID NO: 182	
péptido 183	EAAAER	SEQ ID NO: 183	
péptido 184	AAAERP	SEQ ID NO: 184	
péptido 185	AAERPG	SEQ ID NO: 185	
péptido 186	AERPGE	SEQ ID NO: 186	
péptido 187	ERPGEA	SEQ ID NO: 187	

Tabla 2	péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 188	RPGEAA	SEQ ID NO: 188	
péptido 189	PGEEAAV	SEQ ID NO: 189	
péptido 190	GEAAVA	SEQ ID NO: 190	
péptido 191	GAQFS	SEQ ID NO: 191	
péptido 192	AQFSK	SEQ ID NO: 192	
péptido 193	QFSKT	SEQ ID NO: 193	
péptido 194	FSKTA	SEQ ID NO: 194	
péptido 195	SKTAA	SEQ ID NO: 195	
péptido 196	KTAAK	SEQ ID NO: 196	
péptido 197	TAAKG	SEQ ID NO: 197	
péptido 198	AAKGE	SEQ ID NO: 198	

péptido 199	AKGEA	SEQ ID NO: 199	
péptido 200	KGEAA	SEQ ID NO: 200	
péptido 201	GEAAA	SEQ ID NO: 201	
péptido 202	EAAAE	SEQ ID NO: 202	
péptido 203	AAAER	SEQ ID NO: 203	
péptido 204	AAERP	SEQ ID NO: 204	
péptido 205	AERPG	SEQ ID NO: 205	
péptido 206	ERPGE	SEQ ID NO: 206	
péptido 207	RPGEA	SEQ ID NO: 207	
péptido 208	PGEAA	SEQ ID NO: 208	

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 209	GEAAV	SEQ ID NO: 209	
péptido 210	EAAVA	SEQ ID NO: 210	
péptido 211	GAQF	SEQ ID NO: 211	
péptido 212	AQFS	SEQ ID NO: 212	
péptido 213	QFSK	SEQ ID NO: 213	
péptido 214	FSKT	SEQ ID NO: 214	
péptido 215	SKTA	SEQ ID NO: 215	
péptido 216	KTAA	SEQ ID NO: 216	
péptido 217	TAAK	SEQ ID NO: 217	
péptido 218	AAKG	SEQ ID NO: 218	
péptido 219	AKGE	SEQ ID NO: 219	
péptido 220	KGEA	SEQ ID NO: 220	
péptido 221	GEAA	SEQ ID NO: 221	
péptido 222	EAAA	SEQ ID NO: 222	
péptido 223	AAAE	SEQ ID NO: 223	
péptido 224	AAER	SEQ ID NO: 224	
péptido 225	AERP	SEQ ID NO: 225	
péptido 226	ERPG	SEQ ID NO: 226	
péptido 227	RPGE	SEQ ID NO: 227	
péptido 228	PGEA	SEQ ID NO: 228	
péptido 229	GEAA	SEQ ID NO: 229	

Tabla 2	Péptido MANS y fragmentos de péptido relacionado con MANS activos		
Péptido No.	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:	
péptido 230	EAAV	SEQ ID NO: 230	
péptido 231	AAVA	SEQ ID NO: 231	
Péptido 232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	SEQ ID NO: 232	RNS
Péptido 233	GKASQFAKTA	SEQ ID NO: 233	RNS2
Péptido 234	RGAQFSKTAAK	SEQ ID NO: 234	
Péptido 235	RAKGE	SEQ ID NO: 235	

5 El péptido MANS se miristoila (denotado como MA), y contiene la secuencia de 24 aminoácidos MA-GAQFSKTAAKGEAAARPGEAAVA. Sin desear estar limitado por la teoría, se teoriza que el péptido interfiere con la proteína MARCKS de longitud completa que se adhiere naturalmente a la membrana celular y que interfiere con la fosforilación de proteína MARCKS mediante quinasa C de proteína (PKC).

10 Se ha mostrado que el péptido MANS proporciona una reducción significativa en la desgranulación de células caliciformes ambas in vitro y in vivo. La MANS también afecta la velocidad de migración de neutrófilos y células madre mesenquimales. La degranulación de leucocitos humanos también se inhibe mediante MANS. En un aspecto de esta invención, el tratamiento de ciertas estirpes de células cancerosas con péptidos relacionados con MANS reduce la migración de aquellas estirpes de células cancerosas. En una realización, los péptidos relacionados con MANS exhiben inhibición de metástasis de células cancerosas. Por lo tanto, en una realización, los péptidos relacionados con MANS proporcionados se pueden utilizar para tratar o prevenir cáncer metastásico en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con MANS exhiben propiedades que los hacen adecuados para uso en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, en una realización, los péptidos relacionados con MANS exhiben solubilidad mejorada con relación a péptido MANS. En otra realización, algunos péptidos relacionados con MANS exhiben vidas medias más largas en plasma que el péptido MANS o con relación a péptidos diferentes de péptidos relacionados con MANS. Los péptidos relacionados

20

con MANS pueden ser útiles en el tratamiento de proliferación de células cancerosas. Por ejemplo, en una realización, los péptidos relacionados con MANS puede inhibir la proliferación y o migración de células cancerosas. En otra realización, algunos péptidos relacionados con MANS pueden proporcionar mayor inhibición de proliferación y o migración de células cancerosas a más bajas concentraciones que el péptido MANS o diferentes péptidos relacionados con MANS.

En un aspecto, el péptido relacionado con MANS se selecciona del grupo que consiste de:

N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106);
 N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106);
 N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219);
 N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106);
 N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No. 121);
 N-acetil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106);
 N-acetil-GAQFS(d)KTAA(d)K (SEQ ID No: 106) (Lys en las posiciones 6 y 10 del péptido son de configuración d);
 N-acetil-RGAQFSKTAAK (SEQ ID No: 234);
 N-acetil-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 234); y
 N-acetil-RAKGE (SEQ ID NO: 235).

En un aspecto, los péptidos que tienen 4 a 24 aminoácidos y que tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas a o son sustancialmente idénticas a las secuencias de aminoácidos encontradas en el péptido MANS pueden ser útiles en uno o más aspectos de esta invención. Estos péptidos en este documento se mencionan como péptidos relacionados con MANS, y los péptidos relacionados con MANS de ejemplo se enumeran en la Tabla 2 como las SEQ ID NOs: 1 a 231, 234, y 235. La Tabla 2 también incluye la secuencia de aminoácidos del péptido de secuencia aleatoria (RNS) No. 232 (SEQ ID NO: 232), que se utiliza como un control y para demostrar que el orden de la secuencia de aminoácidos puede ser relevante para la eficacia en esta invención, así como también un segundo péptido de control aleatorio 233 (RNS2; SEQ ID NO: 233). Los péptidos 234 y 235 (SEQ ID NO: 234 y 235) son homólogos de péptido sustituidos de arginina en terminal N de los péptidos 106 y 219, respectivamente. La arginina se puede acilar con, por ejemplo, un grupo acetilo o un grupo miristoilo.

En una realización, los péptidos que pueden ser útiles en la invención actual se pueden seleccionar del grupo que consiste de péptidos sintéticos que tienen las secuencias de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2 (que excluyen los péptidos de secuencia aleatoria 232 y 233).

En otra realización, los péptidos que pueden ser útiles en la invención actual se puede seleccionar de péptidos de secuencias de aminoácidos que se enumeran en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 1 a 231 (inclusive), 234, y 235) y que se modifican químicamente en el terminal N y/o terminal C.

Las modificaciones químicas del terminal N independientes preferidas de los péptidos enumerados en la Tabla 2 incluyen la modificación del grupo amina de terminal N mediante la acilación del aminoácido de terminal N del péptido en la forma de una amida seleccionada del grupo que consiste de:

- una amida de un ácido carboxílico C₂ (acetil) a C₂₄ alifático que puede ser lineal, ramificada, saturada, o insaturada,
- una amida de ácido trifluoroacético,
- una amida de un ácido benzoico, y
- una amida de un ácido alquil sulfónico C₁ a C₂₄ alifático; o
- el grupo amina de terminal N del aminoácido de terminal N del péptido se puede alquilar con un grupo seleccionado del grupo que consiste de:
 - un grupo alquilo C₁ (metilo) a C₂₄ alifático,
 - un grupo 2-(alquilo C₁ a C₂₄ alifático)oxietilo lineal,
 - un grupo omega-metoxi-poli(etilenooxi)n-etilo, en el que n es desde 0 hasta 10.

Las modificaciones de terminal C independientes preferidas químicas de los péptidos enumerados en la Tabla 2 incluyen la formación de amida en el grupo de ácido carboxílico de terminal C del aminoácido de terminal C del péptido en la forma de una amida seleccionada del grupo que consiste de:

- una amida de amoniaco,
- una amida de una alquil amina C₁ a C₂₄ alifática,
- una amida de una alquil amina C₂ a C₂₄ alifática sustituida con hidroxilo,
- una amida de un grupo (alquilo C₁ a C₂₄ alifático)oxietilamina lineal, y
- una amida de un grupo omega-metoxi-poli(etilenooxi)n-etilamina, en el que n es desde 0 hasta 10.

Adicionalmente, el grupo de ácido carboxílico de terminal C del aminoácido de terminal C del péptido está opcionalmente en la forma de un éster seleccionado del grupo que consiste de:

- un éster de un alquil alcohol C₁ a C₂₄ alifático,

- un éster de un grupo 2-(omega-metoxi-poli(etilenooxi)_n)-etanol, en el que n es desde 0 hasta 10, y
- un éster de una PEG-amina lineal, el componente de PEG de peso molecular desde 1,000 hasta 25,000 Daltons.

5 En una realización, las porciones alifáticas de los grupos tales como grupos de ácido carboxílico y grupos ácido sulfónico y alcohol y grupos amino pueden comprender un anillo de por lo menos C3 (es decir, por lo menos un anillo ciclopropilo).

10 En una realización, el péptido se puede modificar en el terminal N, por ejemplo, por un grupo acetilo o un grupo miristoilo, como una amida de terminal N, tal como Acetil-GAQFSKTAAK (acetilo de terminal N SEQ ID No: 106) y miristoil- GAQFSKTAAK (miristoilo de terminal N SEQ ID No: 106), respectivamente. En otra realización, el péptido se puede modificar en el terminal C (por ejemplo, mediante una amida con amoniaco) tal como GAQFSKTAAK-NH₂ (amida de terminal C SEQ ID No: 106). En otra realización, el péptido se puede modificar en el terminal N y se puede modificar en el terminal C, por ejemplo, como el N-acetil- péptido-C-amida (con amoniaco) tal como Acetil-GAQFSKTAAK-NH₂ (acetilo de terminal N SEQ ID No: 106 amida de terminal C) y Miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (miristoilo de terminal N SEQ ID No: 106 amida de terminal C). Estos péptidos se pueden utilizar en los métodos de esta invención y para determinar su habilidad para inhibir la metástasis de células cancerosas.

20 En una realización, un péptido que puede encontrar uso en esta invención se puede seleccionar del grupo de péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos AKGE (SEQ ID No: 219). Dichos péptidos incluyen la SEQ ID No: 1 a la SEQ ID No: 54, SEQ ID No: 56 a la SEQ ID No: 64, SEQ ID No: 67 a la SEQ ID No: 75, SEQ ID No: 79 a la SEQ ID No: 87, SEQ ID No: 93 a la SEQ ID No: 100, SEQ ID No: 108 a la SEQ ID No: 114, SEQ ID No: 124 a la SEQ ID No: 129, SEQ ID No: 141 a la SEQ ID No: 145, SEQ ID No: 159 a la SEQ ID No: 162, SEQ ID No: 178 a la SEQ ID No: 180, SEQ ID No: 198, SEQ ID No: 199, SEQ ID No: 219, y SEQ ID NO: 235. En una realización actualmente preferida, estos péptidos se miristoilan o acetilan en el grupo amino de terminal N.

25 En una realización, un péptido de la invención se puede utilizar en un método para atenuar la metástasis de una célula cancerosa hacia un gradiente de concentración creciente de un agente quimiotáctico en un fluido o tejido, el método que comprende tratamiento de dicha célula cancerosa con una cantidad de migración-inhibición de un péptido de migración-modulación e incubación de dicha célula con dicho péptido para formar una célula cancerosa inhibida en migración, en la que el péptido es un péptido relacionado con MANS.

30 En una realización, el péptido de migración-modulación se selecciona del grupo que consiste de péptidos relacionados con MANS. En otro aspecto, el péptido relacionado con MANS comprende la secuencia de aminoácidos GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106).

35 En otra realización, el péptido relacionado con MANS se selecciona del grupo que consiste de N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID No: 1) N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV (SEQ ID No: 2); N-miristoil- GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAA (SEQ ID No: 4); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEA (SEQ ID No: 7); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEQ ID No: 11); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEQ ID No: 16); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERP (SEQ ID No: 22); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAER (SEQ ID No: 29); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEQ ID No: 37); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAA (SEQ ID No: 46); N-miristoil- GAQFSKTAAKGEEAA (SEQ ID No: 56); N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEA (SEQ ID No: 67); N-miristoil-GAQFSKTAAKGE (SEQ ID No: 79); N-miristoil-GAQFSKTAAKG (SEQ ID No: 92); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106); N-miristoil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121); N-miristoil-GAQFSKTA (SEQ ID No: 137); N-miristoil-GAQFSKT (SEQ ID No: 154); N-miristoil-GAQFSK (SEQ ID No: 172), N-miristoil-GAQFS (SEQ ID No: 191), N-miristoil-GAQF (SEQ ID No: 211), N-acetil-RGAQFSKTAAK (SEQ ID No: 234), N-acetil-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 234), N-acetil- RAKGE (SEQ ID NO: 235), y una combinación de los mismos.

50 En otra realización, el péptido relacionado con MANS se selecciona del grupo que consiste de:

- N-miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID No: 1; péptido MANS);
- N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106; BIO-11000);
- N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106; BIO-11006);
- N-acetil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106; BIO-11026);
- N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219; BIO-91200);
- N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106; BIO-11002);
- N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No. 121; BIO-10901)
- N-acetil-RGAQFSKTAAK (SEQ ID No: 234; BIO-11027)
- N-acetil-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 234; BIO-11028), y
- N-acetil-RAKGE (SEQ ID NO: 235; BIO-91204).

65 En una realización, la dosis que inhibe la metástasis de un péptido de esta invención puede estar en el rango de aproximadamente 0.01 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día. En una realización adicional, la dosis que inhibe la metástasis de un péptido es aproximadamente 0.1 mg/kg/día a aproximadamente 5.0 mg/kg/día. En aún una realización adicional, la dosis que inhibe la metástasis de un péptido es aproximadamente 0.5 mg/kg/día a aproximadamente 2.5 mg/kg/día. Por ejemplo, la dosis que inhibe la metástasis de un péptido de esta invención es

aproximadamente 0.01, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.75, aproximadamente 1.0, aproximadamente 1.25, aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.75, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.25, aproximadamente 2.5, aproximadamente 2.75, aproximadamente 3.0, aproximadamente 3.5, aproximadamente 4.0, aproximadamente 5.0, aproximadamente 6.0, aproximadamente 7.0, aproximadamente 8.0, aproximadamente 9.0, aproximadamente 10.0, o más mg/kg/día.

En una realización de la presente invención, la administración es mediante rutas oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, inhalación o supositorio. En otra realización, la administración es mediante inhalación de una solución o suspensión líquida o formulación de polvo seco del compuesto inhibidor de MARCKS. En una realización, un compuesto inhibidor de MARCKS se administra a un sujeto en necesidad del mismo mediante inhalación de una solución o suspensión líquida o formulación de polvo seco del compuesto inhibidor de MARCKS. Por ejemplo, en una realización, un péptido relacionado con MANS se administra a un sujeto en necesidad del mismo mediante inhalación de una solución o suspensión líquida o formulación de polvo seco del péptido relacionado con MANS. En otra realización, un péptido relacionado con MANS se administra mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, o intramuscular, o mediante administración oral o supositorio.

En la presente invención, el péptido relacionado con MANS se puede administrar es mediante inyección de una formulación líquida del péptido, y en el que la formulación líquida es isotónica, y en el que la formulación líquida o suspensión está tamponada, y en la que la inyección es sistémica en un sujeto. En otra realización, la inyección está en la región de un tumor. En otra realización, la inyección está en el tumor.

Los péptidos de esta invención se pueden formular utilizando uno o más excipientes o ingredientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para la administración a células cancerosas, tales como células cancerosas en un tumor primario. Dichas composiciones pueden ser como soluciones o suspensiones en un líquido, especialmente en una solución tamponada, en el que el tampón de fosfato es útil, cuando la administración por inyección o por inhalación es útil. Las soluciones o suspensiones isotónicas son realizaciones preferidas.

Se anticipa que la administración de un anticuerpo, polinucleótido, molécula de ácido nucleico o composición de péptidos de esta invención en mamíferos tales como caninos, felinos y pacientes humanos, puede ser efectiva si se realiza mediante inyección en una región tumoral primaria (por ejemplo, directamente en un tumor primario, o en un margen de un tumor primario, o en un vaso sanguíneo que alimenta un tumor primario) en el mamífero, en el que la inyección se realiza a intervalos regulares (por ejemplo, cada 1 a cada 72 horas), opcionalmente en combinación con o por separado con uno o más de otros fármacos de quimioterapia adicionales.

Uno o más agentes terapéuticos adicionales, que incluyen fármacos quimioterapéuticos y anticuerpos específicos para el cáncer, se puede administrar adicionalmente al anticuerpo de inhibidor de MARCKS, polinucleótido, molécula de ácido nucleico, o formulación de péptido, antes, durante, o después de la administración del péptido. Los fármacos quimioterapéuticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, temozolomida, gemcitabina, capecitabina, cladribina, clofarabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, metotrexato, pemetrexed, pentostatina, tioguanadina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, topotecan, irinotecan, etoposida, eniposida, colchicina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, paclitaxel, y docetaxel. Agentes específicos contra el cáncer y anticuerpos de ejemplo incluyen pero no se limitan a, Afatinib, Aldesleukina, Alemtuzumab, Axitinib, Belimumab, Bevacizumab, Bortezomib, Bosutinib, Brentuximab vedotin, Cabozantinib, Canakinumab, Carfilzomib, Cetuximab, Crizotinib, Dabrafenib, Dasatinib, Denosumab, Erlotinib, Everolimus, Gefitinib, Ibritumomab tiuxetan, Ibrutinib, Imatinib, Ipilimumab, Lapatinib, Nilotinib, Obinutuzumab, Ofatumumab, Panitumumab, Pazopanib, Pertuzumab, Ponatinib, Regorafenib, Rituximab, Romidepsin, Ruxolitinib, Sipuleucel-T, Sorafenib, Temsirolimus, Tocilizumab, Tofacitinib, Tositumomab, Trametinib, Trastuzumab, Vandetanib, Vemurafenib, Vismodegib, Vorinostat, y Ziv-aflibercept.

La administración puede ser, por ejemplo, por inhalación tal como un aerosol o aerosol líquido o en polvo seco, como en las vías respiratorias de un paciente con cáncer, cuyo aerosol puede formar un recubrimiento en un tejido que contiene una célula cancerosa, o como un líquido para inyección en un fluido o tejido que contenga o esté en contacto con una célula cancerosa antes de la metástasis. Se contempla el uso de un agente surfactante suave como un fosfolípido para ayudar a la solubilización y la absorción de la transmembrana del péptido relacionado con MANS. La administración también puede ser, por ejemplo, mediante un polvo seco, preferiblemente un polvo de nanopartículas o micropartículas, aplicable por aspersión sobre un tejido que contiene una célula cancerosa. La adición de un portador de carbohidratos en micropartículas a la preparación del péptido facilitará el suministro por inhalación del péptido en nanopartículas en las vías respiratorias y en las áreas de tejido epitelial.

Un método preferido de aplicación del anticuerpo inhibidor de MARCKS, polinucleótido, molécula de ácido nucleico, o composición de péptido comprende la inyección en tejido en o proximal a un tumor, cuyo tumor contiene una célula cancerosa antes de la metástasis.

Como se utiliza en este documento, la frase "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de las composiciones utilizadas en la práctica de la invención que es efectiva

para lograr el efecto deseado, es decir, para inhibir la metástasis y/o la proliferación de una célula cancerosa y/o para inhibir, tratar o prevenir el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo. Por lo tanto, la actividad contemplada por los presentes métodos incluye tanto tratamiento médico terapéutico como tratamiento profiláctico, según sea apropiado, que incluye, por ejemplo, una reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de un cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de esta invención es normalmente una cantidad tal que cuando se administra en una composición de excipiente fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración intracelular y una concentración local efectivas en el tejido.

“Cáncer” en el presente documento se refiere o describe la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (que incluye liposarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endotelioarcoma, linfangiosarcoma linfangioendotelioma sarcoma, leiomiomasarcoma, rabiomasarcoma, fibrosarcoma, myxosarcoma, condrosarcoma), osteoclastoma, tumores neuroendocrinos, mesotelioma, cordoma, sinovioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células epidermoides (por ejemplo, cáncer de células epidermoides epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide del pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de glándula salival, carcinoma de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano, carcinoma de pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, tumor de Ewing, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hematoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom; enfermedad mielodisplásica, enfermedad de cadena pesada, tumores neuroendocrinos, Schwannoma y otros carcinomas, cáncer de cabeza y cuello, neoplasias mieloides tales como leucemias mielógenas agudas, que incluyen AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, que incluyen leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo, tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer de páncreas, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer de útero, cérvix o cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado primario o endometrio) cáncer, tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), neoplasias hematológicas y afecciones neoplásicas similares, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras de linfocito, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores de células T y NK maduras, que incluyen leucemias de células T periféricas, leucemia de células T adultas/linfomas de células T y Leucemia linfocítica granular grande, cánceres óseos osteolíticos y metástasis óseas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe observarse que estos ejemplos, como las realizaciones descritas anteriormente, son ilustrativos y no deben interpretarse como que limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Efectos de los péptidos en la migración de estirpes celulares de cáncer

Protocolo para un ensayo de migración

Las células CL1-5, una estirpe celular agresivamente metastásica derivada de un adenocarcinoma humano, se cultivaron en medios RPMI 1640 con FBS al 10%, 37°C a un oxígeno al 95%/ CO₂ al 5% hasta que estén listas para uso. Se utilizaron placas Transwell (24 pozos, tamaño de poro de 8 µm; Costar, Cambridge, Mass., EE.UU.) Para realizar el ensayo de migración. Las cámaras inferiores de las placas Transwell se cargaron con 600 µl de medio basal que contenía un FBS al 10%. Las células (1 × 10⁵) se pretrataron con 50 o 100 µM del péptido de prueba indicado durante 30 minutos, y luego se suspendieron en 100 µl de medio basal que contenía BSA al 1% y se agregaron a la cámara superior, y luego las células se incubaron a 37°C durante 12 h. Las células en la superficie superior de los filtros se eliminaron utilizando hisopos de algodón, y las células que migraron a la superficie inferior

de los filtros se lavaron, se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y se contaron bajo el microscopio. El porcentaje de cambio en la migración se determinó contando el número de células que migraron a la superficie inferior de los filtros. Se contaron por lo menos 3 campos microscópicos separados por membrana (n=4).

5 Método alternativo de Transwell

Las células primarias CL1-5 se originaron a partir de cáncer de pulmón adenocarcinoma humano. Se utilizaron placas Transwell con 24 pozos, tamaño de poro de 8 μ (Costar, Cambridge, Mass., EE.UU.) Para realizar el ensayo de migración. Las cámaras inferiores de las placas Transwell se cargaron con 600 μ L de medio basal que contenía un FBS al 10%. Las células ($1-2 \times 10^5$) se suspendieron en 100 μ L de medio basal que contenía BSA al 1%. El péptido de prueba a la concentración deseada se agregó a la cámara superior directamente o después de la preincubación con células cancerosas. Las placas se incubaron a 37°C durante 12 horas. Las células en la superficie superior de los filtros se eliminaron utilizando hisopos de algodón. Las células que migraron a la superficie inferior de los filtros se lavaron, se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y se contaron bajo el microscopio. Se cuentan por lo menos cinco campos microscópicos separados por membrana (n=3). El porcentaje de cambio en la migración se determinó al contar el número de células que migraron a la superficie inferior de los filtros.

El recuento significa el número real de células que migraron a la cámara inferior y se contaron con un microscopio de luz con un aumento de 40x, presentado como el número promedio de células en 10 campos elegidos al azar para cada tratamiento.

El "índice" se calculó al dividir el número de células que migraron en presencia de péptidos por el número de células que migraron al azar (grupo de control). Índice = recuento de células de control/recuento de células tratadas. Este cálculo puede reflejar el grado en que la migración de las células se bloqueó mediante un tratamiento previo de 30 minutos con péptidos relacionados con MANS.

La Figura 1 presenta un campo de recuento de células de un control negativo después de un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 2A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido MANS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 2B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido MANS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 3A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido RNS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 3B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido RNS seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 4A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoilo - SEQ ID NO: 106 - NH2 seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 4B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoilo - SEQ ID NO: 106 - NH2 seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 5A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido relacionado con MANS N-acetil - SEQ ID NO: 121 seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 5B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido relacionado con MANS N-acetil - SEQ ID NO: 121 seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 6A presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 50 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoilo - SEQ ID NO: 219 seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 6B presenta un campo de recuento de células obtenido después del tratamiento previo con 100 μ molar de péptido relacionado con MANS N-miristoilo - SEQ ID NO: 219 seguido por un tiempo de migración de 12 horas.

La Figura 7A presenta números de células migradas obtenidos 12 horas después del tratamiento previo a 50 μ molar con el péptido MANS, péptido RNS, y péptidos de prueba relacionados MANS N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID NO: 6), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID NO: 121), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID NO: 219), y control (sin péptido). Para el péptido MANS, el número de células fue aproximadamente 40; para el péptido RNS, el número de células fue aproximadamente 95; para N-miristoil-GAQFSKTAAKNH2 (SEQ ID NO: 106), el número de células fue

aproximadamente 50); para N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID NO: 121), el número de células fue aproximadamente 60; y para N-miristoil-AKGE (SEQ ID NO: 219), el número de células fue aproximadamente 65. Cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219) números de células migradas significativamente reducidos de la estirpe celular NSCLC humana agresiva (CL1-5) con relación al control y al péptido de secuencia aleatoria RNS.

La Figura 7B presenta números de células migradas obtenidos 12 horas después del tratamiento previo a 100 μ molar con el péptido MANS, péptido RNS, y péptidos de prueba relacionados MANS N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID NO: 106), N-acetil- GAQFSKTAA (SEQ ID NO: 121), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID NO: 219), y control (sin péptido). para el péptido MANS, el número de células fue aproximadamente 20; para el péptido RNS, el número de células fue aproximadamente 90; para N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID NO: 106), el número de células fue aproximadamente 25; para N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID NO: 121), el número de células fue aproximadamente 35; y para N-miristoil-AKGE (SEQ ID NO: 219), el número de células fue aproximadamente 40; para el control (sin péptido), el número de células fue aproximadamente 90. Cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, N-miristoil- GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID NO: 106), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID NO: 121), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID NO: 219) demuestra números de células migradas significativamente reducidos de la estirpe celular NSCLC humana agresiva (CL1-5) con relación al control y al péptido de secuencia aleatoria RNS.

La Figura 8A presenta el índice de migración de células de la estirpe celular del NSCLC humano agresivo, en el que un valor alto del índice de migración significa menor migración después del tratamiento previo con un péptido o composición de péptidos de la invención a 50 μ molar seguido por 12 horas de tratamiento de acuerdo con el protocolo. Los siguientes son los valores del índice de migración: control = 1; péptido MANS = aproximadamente 2.5; péptido RNS = aproximadamente 1.1; N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106) = aproximadamente 2.7; N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121) = aproximadamente 1.75; y N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219) = aproximadamente 1.7. Cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219) demostraron números de índice de migración significativamente en aumento con relación al control y al péptido RNS.

La Figura 8B presenta el índice de migración de células de la estirpe celular del NSCLC humano agresivo, en el que un valor alto del índice de migración significa menor migración después del tratamiento previo con un péptido o composición de péptidos de la invención a 100 μ molar seguido por 12 horas de tratamiento de acuerdo con el protocolo. Los siguientes representan los valores del índice de migración: control = 1; péptido MANS = aproximadamente 4.3; péptido RNS = aproximadamente 1; N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106) =aproximadamente 3.8; N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121) = aproximadamente 2.7; y N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219) = aproximadamente 2.4. Cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, N-miristoil- GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID No: 121), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219) demostraron números de índice de migración significativamente en aumento con relación al control y al péptido RNS.

La Figura 9 presenta gráficamente los números de células respectivos lado a lado y los resultados del número de índice de migración de 50 μ molar de tratamiento previo con péptido en experimentos utilizando la estirpe celular NSCLC humana agresiva (CL1-5). El control sin tratamiento previo con péptido proporciona un número de células de aproximadamente 105; y el número de índice de migración = 1.0. Los resultados después de 50 μ molar de tratamiento previo con el péptido MANS seguido por 12 horas de acuerdo con el protocolo proporcionan un número de células de aproximadamente 45; de índice de migración de aproximadamente 2.5. Los resultados después de 50 μ molar de tratamiento previo con el péptido RNS proporcionan un número de células de aproximadamente 90; e índice de migración de aproximadamente 1.3. Los resultados después de 50 μ molar de tratamiento previo con N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106) proporcionan un número de células de aproximadamente 70; e índice de migración de aproximadamente 1.5. Los resultados después de 50 μ molar de tratamiento previo con BIO-11006 proporcionan un número celular de aproximadamente 50; e índice de migración de aproximadamente 2. Los resultados demuestran que los valores altos del índice de migración se asocian con menor migración, y la menor migración se asocia con valores altos de índice de migración. Cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, N-miristoil- GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106), y N-acetil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106) demostraron números de células migradas reducidos y números de índice de migración en aumento con relación al control y al péptido RNS.

La Figura 10 presenta gráficamente números de células respectivos lado a lado y resulta el número de índice de migración para 100 μ molar de tratamiento previo con péptido en experimentos utilizando la estirpe celular NSCLC humana agresiva (CL1-5). El control sin tratamiento previo con péptido proporciona un número de células de aproximadamente 105; y el número de índice de migración = 1.0. Los resultados después de 100 μ molar de tratamiento previo con el péptido MANS seguido por 12 horas de acuerdo con el protocolo proporcionan un número de células de aproximadamente 35; e índice de migración de aproximadamente 3.5. Los resultados después de 100 μ molar de tratamiento previo con el péptido RNS proporcionan un número de células de aproximadamente 95; e índice de migración de aproximadamente 1.2. Los resultados después de 100 μ molar de tratamiento previo con N-miristoil-GAQFSKTAANKH2 (SEQ ID No: 106) proporcionan un número de células de aproximadamente 50; e índice de

migración de aproximadamente 2.3. Los resultados después de 100 μmolar de tratamiento previo con N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) proporcionan un número de células de aproximadamente 50; e índice de migración de aproximadamente 2.1. Los resultados después de 100 μmolar de tratamiento previo con N-miristoil- AKGE (SEQ ID No: 219) proporcionan un número de células de aproximadamente 55; e índice de migración de aproximadamente 2.1. Los resultados demuestran que valores altos de índice de migración se asocian con menos migración celular, y menos migración celular se asocia con valores altos de índice de migración. Cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, N-miristoil- GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), y N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219) demostraron números de células migradas reducidos y números de índice de migración en aumento con relación al control y al péptido RNS.

EJEMPLO 2. Inhibición de metástasis de cáncer de pulmón por el péptido MANS o BIO-11006 utilizando modelo de xenoinjerto de inyección de pulmón ortotópico.

La actividad metastásica de células cancerosas in vivo después del tratamiento con el péptido MANS o BIO-11006 se evaluó en el modelo de xenografía de inyección ortotópica de pulmón. Después del tratamiento previo con PBS, o PBS + MANS, N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (SEQ ID NO: 106), o con el péptido RNS de control a 100 μM durante 4 horas, se inyectaron células PC-9 en el lóbulo izquierdo del pulmón de ratones desnudos. Siete días después, estos ratones recibieron tratamiento sistémico con solo PBS (Con), RNS (péptido de control adicional), MANS o N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) a 50 nmoles por inyección intraperitoneal una vez cada tres días. A los 25 días (6 inyecciones) después de la siembra de estas células tumorales, los ratones se sacrificaron y se contó el número de nódulos tumorales metastatizados en el pulmón contralateral y otros órganos. Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, los grupos tratados con MANS, RNS o N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) no mostraron diferencias en el tamaño promedio del tumor en el sitio de inyección en comparación con los tratados con PBS o entre sí, lo que sugiere que estos tratamientos no afectan la tumorigénesis. Sin embargo, se observó una disminución significativa de los nódulos metastásicos en el pulmón contralateral y otros órganos en los ratones tratados con MANS y N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) en comparación con los grupos tratados con PBS o RNS; de hecho, el tratamiento con los péptidos MANS o BIO-11006 esencialmente bloqueó totalmente todas las metástasis del tumor a otros sitios pulmonares, así como a otros órganos.

Tabla 3. El efecto supresor de los péptidos relacionados con MARCKS en la metástasis del cáncer in vivo

Grupo	Tamaño de tumor (mm)	No. de tumores pulmonares metastásicos	Metástasis (ratones afectados/ratones totales)			
	Media ± EE	Media 6SE (L't; R't)	Corazón	Bazo	Intestinos	Diafragma
PBS (n=3)	1.50±0.26	1.67±0.29; 5.67±0.77	1/1	2/3	1/3	2/3
RNS (n=4)	1.72±0.41	1.00±0.40; 5.75±2.01	3/4	2/4	1/4	3/4
MANS (n=4)	1.48±0.54	0;0	0/4	0/4	0/4	0/4
BIO-11006 (n=2)	1.61±0.37	0;0	0/2	0/2	0/2	0/2

Estos resultados in vivo apoyan el concepto de que la inhibición de la función MARCKS por los péptidos relacionados con MANS puede reducir la diseminación metastásica de células de cáncer de pulmón in vivo.

Ejemplo 3. Efectos peptídicos en la migración de estirpes celulares de cáncer A549

La estirpe celular epitelial alveolar derivada de adenocarcinoma humano A549 (una estirpe celular invasiva) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivó en RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomina. En matraces de cultivo de tejidos de 75 cm². Las células alcanzaron la confluencia en el tercer día de cultivo a 37°C en una atmósfera de aire al 95% y CO₂ al 5% y se mantuvieron mediante un paso en serie.

Los péptidos de prueba (MANS, RNS, BIO-11006, BIO-11000, N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106), N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219), y N-acetil-GAQFSKTA (SEQ ID No: 121) se disolvieron en PBS a un pH de 7.0; mezcla lenta de vórtice durante aproximadamente dos horas de solubilidad ayudada.

Se utilizaron placas Transwell (24 pozos, tamaño de poro de 8 μM; Costar, Cambridge, Mass., EE.UU.) para realizar el ensayo de migración. Las cámaras inferiores de las placas Transwell se cargaron con 600 μl de medio basal que contenía un FBS al 10%. Las células (1x10⁵) se suspendieron en 100 μl de medio basal que contenía BSA al 1% y se agregaron a la cámara superior, y las placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 12 horas en PBS

(control), o los péptidos de prueba indicados a 10, 25 o 50 μM . Las células sobre la superficie superior de los filtros se eliminaron utilizando hisopos de algodón. Las células que migraron a la superficie inferior de los filtros se lavaron, se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y se contaron bajo el microscopio. El porcentaje de cambio en la migración se determina al contar el número de células que migraron a la superficie inferior de los filtros. Se cuentan por lo menos cuatro campos microscópicos separados por membrana, con un total de tres experimentos repetidos en cada concentración. El software de estadísticas "Prizm" se utilizó para el análisis de datos.

Como se muestra en la figura 11, el tratamiento con cada uno de los péptidos de prueba dio como resultado un número de células reducido después del tratamiento en relación con el control (sin péptido) o con el péptido RNS. A 50 μM , cada uno de los péptidos relacionados con MANS MANS, BIO-11006, N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106), N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No: 106), N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219), y N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 121) mostraron una disminución en el número de células migradas y un mayor número de índices de migración en relación con el control y el péptido RNS. A concentraciones más bajas, el efecto de varios péptidos relacionados con MANS fue significativamente diferente incluso en comparación con el péptido MANS. En particular, a 25 μM , el tratamiento con BIO-11006, BIO-11002, o N-miristoil-AKGE (SEQ ID No: 219) dio como resultado un número de células significativamente reducido en comparación con el control (sin péptido) o el control del péptido RNS, así como en comparación con el péptido MANS (Figura 11).

En conjunto, los resultados de los estudios mostraron que los péptidos relacionados con MANS pueden bloquear la migración de estirpes celulares de cáncer agresivas, y que varios péptidos relacionados con MANS mostraron un efecto sobre la migración de por lo menos tres estirpes de células de cáncer diferentes. Los resultados de los estudios también mostraron que por lo menos dos péptidos relacionados con MANS diferentes fueron capaces de bloquear o inhibir la metástasis de células cancerosas inyectadas en mamíferos (es decir, ratones).

Ejemplo 4. Efectos del péptido BIO-11006 en la implantación de cáncer de pulmón

En este estudio, se evaluó la inhibición de la metástasis del cáncer de pulmón por el péptido N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) en un modelo de implante de cáncer de pulmón ortotópico en ratones SCID. Se suspendieron células de adenocarcinoma humano (PC-9) ($1-2 \times 10^5$) en 40 μL de PBS, pH 7.4 que contenían 0.5 mg/mL de Matrigel™ (BD Bioscience) y se inyectaron en el pulmón izquierdo de ratones SCID (n=3) utilizando una jeringa con aguja de calibre 29. N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (100 mM, en PBS) se administró ya sea (a) por inyección i.p. (50 μL) una vez al día durante 22 días iniciando a los 3 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa o (b) mediante inhalación por aerosol utilizando un Sistema de Suministro de Nebulizador (Aeroneb Lab) durante 30 min una vez al día durante 22 días iniciando a los 3 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa. Los resultados del estudio se representan en la Figura 12, que presenta gráficamente el número promedio de tumores en el pulmón derecho, corazón, y diafragma como una función de la ruta de administración del compuesto de prueba (inyección ip versus inhalación). Tanto la administración i.p. y en aerosol de N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) redujeron la metástasis de células cancerosas en más de 50% en el pulmón derecho y corazón, y 100% en el diafragma. Por lo tanto, ambas rutas de administración tienen efectos inhibidores significativos sobre la metástasis de células cancerosas.

EJEMPLO 5. Inhibición de metástasis de cáncer de pulmón

En este estudio, se investigó la inhibición de metástasis de cáncer de pulmón mediante N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) en un modelo de implante de cáncer de pulmón ortotópico en ratones SCID. Se suspendieron células de adenocarcinoma humano (PC-9) ($1-2 \times 10^5$) en 40 μL de PBS que contenía 0.5 mg/mL de Matrigel™ (BD Bioscience) y se inyectaron en el pulmón izquierdo de ratones SCID (n=3) utilizando una aguja de calibre 29. Se administró N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) iniciando ya sea a los 4 días o 15 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa mediante aerosol utilizando 100 μM de solución en PBS mediante el Sistema de Suministro de Nebulizador (Aeroneb Lab) durante 30 min una vez al día durante 25 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa. Al final del experimento, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tejidos de los pulmones, corazón y diafragma y se midió el número de nódulos tumorales en cada tejido. Los resultados de este experimento se presentan gráficamente en las Figuras 13 y 14. La Figura 13 muestra que cuando se inició el tratamiento a los 4 días después de inoculación de células cancerosas, el tumor metástasis se inhibió por 60-90% en el pulmón izquierdo, corazón, y diafragma, y en 100% en el pulmón derecho. Cuando se inició el tratamiento a los 15 días después de inoculación de células cancerosas, la inhibición de la metástasis de tumor fue aproximadamente 50% en los pulmones, corazón, y diafragma. La Figura 14 representa el número total de nódulos de tumor encontrados en todos los tejidos cuando se inició el tratamiento de péptido a los 15 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa o 4 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa. Como se muestra en la Figura 14, el tratamiento de péptido que inicia a los 15 días posteriores a la inoculación de célula cancerosa resulta en nódulos de tumor reducidos, y el tratamiento de péptido que inicia a los 4 días después de inoculación resulta incluso nódulos de tumor reducidos adicionales.

Ejemplo 6. Eficacia antimetastásica de los péptidos

Este ejemplo demuestra la eficacia antimetastásica de los compuestos de prueba de la invención en ratones SCID que portan células de adenocarcinoma de pulmón humano. Los ratones hembra NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NCrHsd, Mus musculus (Harlan, Países Bajos), alojados en jaulas con ventilación individual, se asignaron al azar a seis grupos de ocho ratones cada uno. Se inyectaron células A549 (2.5 x 10⁶) en los ratones a través de la vena de la cola. El grupo de control recibió vehículo PBS en aerosol; mientras que los grupos 2 y 3 recibieron el compuesto de prueba en aerosol N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) ya sea desde -1 día antes de la inyección de células cancerosas (grupo 2) o desde +3 días después de la inyección de células cancerosas (grupo 3) en días alternos durante 7 semanas a través de nebulizador (Aeroneb Lab). Los grupos 4 y 5 recibieron el péptido MANS del compuesto de prueba en aerosol desde -1 día antes de la inyección de la estirpe celular de cáncer (grupo 4) o desde +3 días después de la inyección de la estirpe celular (grupo 5) en días alternos durante 7 semanas a través de un nebulizador (Aeroneb Lab). Para el suministro de aerosol, se preparó una solución de cada compuesto de prueba (100 µM) en PBS, pH 7.0. Para cada tratamiento, 5 mL de solución del compuesto de prueba se aerosolizaron durante 30 minutos en una cámara que contenía cuatro ratones a la vez. Los ratones se monitorizaron para determinar el peso corporal en días alternos durante 7 semanas.

Un grupo de ratones (n=7) sirvió como control normal. Estos fueron ratones no tratados sin tratamiento que se utilizaron para controlar el estado de salud de los ratones durante el período de estudio. Todos los animales de todos los grupos fueron sacrificados en el día 53. Los resultados se proporcionan en la Tabla 4 y la Figura 15. La Figura 15 compara el número de nódulos metastásicos en los pulmones después de la administración respectiva de de N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) y péptido MANS en el día 53 después de la inyección de células A549. La Tabla 4 muestra el número de nódulos metastásicos en los pulmones, así como el número de animales con nódulos tumorales focales y/o metástasis a distancia. En general, los péptidos de prueba mostraron una inhibición sustancial de la metástasis tumoral (70-80%) en animales a los que se administró BIO-11006 o péptido MANS a partir del día -1 o el día +3 en relación con la inyección de células A549 (Figura 15). Más aún, el número de nódulos metastásicos en ratones tratados se redujo significativamente en relación con los receptores de control del vehículo, y ninguno de los ratones tratados mostró evidencia de metástasis a distancia (Tabla 4). Hubo pocos nódulos tumorales focales en 7/8 de ratones tratados con el péptido N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) a partir del Día -1 o el Día +3 en relación con la inyección de células A549.

TABLA 4. Nódulos metastásicos y metástasis a distancia en ratones tratados con N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) o MANS

Grupo	No. de nódulos metastásicos en pulmones Grupo Media ± EEM	Observaciones
Control de vehículo	97±21	Nódulos tumorales multifocales en todos los animales (8/8) Evidencia de metástasis a distancia en diafragma y esternón (2/8)
Péptido de N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (-1 Día del grupo de tratamiento)	34±14	Pocos nódulos tumorales focales en 7/8 animales No hay metástasis a distancia
Péptido e N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID No: 106) (+3 Día del grupo de tratamiento)	21±6	Pocos nódulos tumorales focales en 7/8 animales No hay metástasis a distancia
péptido de MANS (-1 Día del grupo de tratamiento)	22±7	Pocos nódulos tumorales focales en 4/8 animales No hay metástasis a distancia
Péptido MANS (+3 Día del grupo de tratamiento)	13±4	Pocos nódulos tumorales focales en 7/8 animales No hay metástasis a distancia

Ejemplo 7. Actividad antimetastásica de los péptidos relacionados con MANS en el melanoma murino

En este estudio, la actividad antimetastásica relativa de los péptidos relacionados con MANS administrados por cuatro vías diferentes se determina utilizando un modelo de ratón singénico. La estirpe celular de melanoma murino B16F10 se inyectan 2x10⁶ células en 200 µl de suspensión celular en medio DMEM en la almohadilla de la pata o entre la piel y el cartílago en el lado dorsal de la oreja; o por inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

Dos días después de la inoculación celular, los animales se asignan al azar y se dividen en grupos que consisten en n=10 en cada grupo. Los animales en diferentes grupos se administran con péptido relacionado con MANS por vía intraperitoneal (ip), intravenosa (iv) o intramuscular (im) respectivamente a una dosis de aproximadamente 6.25 mg/kg. En algunos grupos, los animales se tratan por vía de inhalación (5 ml de péptido relacionado con MANS 0.1 mM en PBS) utilizando un nebulizador preclínico (Aeroneb Lab; Aerogen). Un grupo de ratones sirve como control de vehículo y se trata con PBS por ruta im. Los péptidos se administran en días alternos durante 6 semanas.

La puntuación del tumor se realiza semanalmente. Después de 6 semanas de tratamiento, todos los animales se sacrifican humanamente y los ganglios linfáticos y otras muestras de tejido se recolectan, se fijan en formalina y se

someten a histopatología para evaluar la presencia de células de melanoma metastásico. Los signos y síntomas tóxicos clínicos se evalúan durante el período de administración de 6 semanas. La carga tumoral y la mortalidad se evalúan al final del período de estudio. Los resultados del estudio mostrarán que los péptidos relacionados con MANS inhiben la metástasis tumoral en un modelo de melanoma murino.

5

Ejemplo 8. Atenuación de ARNip de MARCKS en células de cáncer

Este estudio se realizó para determinar los efectos de la atenuación de ARNip de la expresión de MARCKS sobre la migración de células cancerosas. Las células de cáncer de pulmón humano PC-9 o A-549 se sembraron en pozos de plástico y se cultivaron hasta que las células alcanzaron el 70% de confluencia. Las células se transfectaron luego con 100 nM de ARNip de MARCKS o ARNip de control (100 nM) de Ambion (Austin, TX) al utilizar el reactivo de duotransfección DharmaFECT (Dharmacon, Lafayette, CO). Después de 72 horas, se recolectaron las células y se separaron cantidades equivalentes de proteínas por SDS/PAGE para el análisis Western blot utilizando anticuerpos específicos de MARKS. Se realizó un análisis de transferencia Western para confirmar la regulación descendente inducida por ARNip de MARCKS endógenas. Como se muestra en las Figuras 16 y 17, la proteína MARCKS se atenuó en aproximadamente un 60% en las células PC9 (Figura 16) y aproximadamente el 50% en las células A549 (Figura 17) en comparación con las células tratadas con ARNip de control.

10

15

20

25

Los efectos de atenuación de MARCKS por ARNip sobre la migración celular se determinaron utilizando un ensayo de Transwell. Tras la eliminación de ARNip, las células PC-9 o A549 se cultivaron en medio RPMI 1640 con FBS al 10% a 37°C, con CO₂ al 5%. Se utilizaron placas Transwell® (24 pozos, tamaño de poro de 8 µm) para los ensayos de migración. Las cámaras inferiores contenían 600 µl de medio basal + FBS al 10%. Las células (1 x 10⁵) se suspendieron en 100 µl de medio basal + BSA al 1% y se agregaron a la cámara superior; Las placas se incubaron durante 12 h. Las células que migraron a la superficie inferior de los filtros se tiñeron con hematoxilina y se contaron. Se contaron por lo menos 3 campos microscópicos separados por membrana.

30

Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 18 y 19. El tratamiento con ARNip de MARCKS inhibió significativamente la migración de las células PC-9 y A549. La atenuación de ARNip de MARCKS dio como resultado una reducción del 90% en la migración celular para la estirpe celular PC9 (Figura 18) y resultó en una reducción de aproximadamente el 50% en la migración celular para la estirpe celular A549 (Figura 19). Por lo tanto, la inhibición de la expresión de MARCKS produce una reducción significativa en la migración de las células cancerosas.

Ejemplo 9. Inhibición de ARNmicro21 aumenta la MARCKS y mejora la migración de células cancerosas

35

40

45

El ARNmicro 21 (miR21) regula los niveles de MARCKS en las células. En estos estudios, las células de cáncer de pulmón humano PC9 se transfectaron con 50 nM o 100 nM de inhibidor de miR21 o un imitador de miR21, o un control negativo de solo vehículo. Los niveles de MARCKS se midieron 48 horas después por Western Blot. El tratamiento con el inhibidor de miR21 (50 nM) aumentó los niveles de MARCKS en las células en ~2.5 veces (Figura 20). Estos valores se correlacionan con la capacidad de migración de las células cuando se colocan en cámaras de migración durante un período de 12 horas. Las células tratadas con el inhibidor de miR21 a 50 o 100 nM mostraron una migración mejorada que se correlacionaba con niveles aumentados de MARCKS, mientras que las células tratadas con imitador de miR21 mostraron una migración disminuida que se correlacionaba con niveles disminuidos de MARCKS (Figura 21). Las células tratadas con control de vehículo HiPerfect mostraron el mismo nivel de migración con respecto a las células PC9 no tratadas (Figura 21). Los resultados del estudio mostraron que un aumento en la expresión de MARCKS a través de la inhibición de miR21 aumenta la migración de células cancerosas. Más aún, la activación de miR21 dio lugar a una disminución de la migración de células PC9.

50

Tomados en conjunto, los estudios mostraron que la migración de células cancerosas y la metástasis de las células cancerosas se pueden inhibir al objetivar MARCKS utilizando varios medios diferentes de inhibición de MARCKS, que incluyen los péptidos relacionados con MANS y los ARNmicro inhibidores, es decir, un imitador de miR21.

55

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales, similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se pueden utilizar en la práctica o la prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen en el presente documento.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biomarck Pharmaceuticals, Ltd. North Carolina State University Parikh, Indu Adler, Kenneth B.

<120> Inhibidores de metástasis

5 <130> BMRK-006/01WO

<150> US 61/808,966

<151> 2013-04-05

<160> 240

<170> PatentIn version 3.5

10

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

<210> 2

<211> 23

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
20

25

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 3

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

35

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

40

Arg Pro Gly Glu Ala Ala
20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

45

<213> Homo sapiens

ES 2 714 863 T3

<400> 5

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val
20

5 <210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

10 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

15 <210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala
20

20 <210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 8

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala
20

30 <210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val
20

35 <210> 10
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <400> 10

ES 2 714 863 T3

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Val Ala
 20

5 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

10 Arg Pro Gly Glu
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 12

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala
 20

20 <210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

25 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala
 20

30 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Val
 20

35 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 15

ES 2 714 863 T3

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

Ala Ala Val Ala
 20

<210> 16
 <211> 19
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 Arg Pro Gly

<210> 17
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Glu

<210> 18
 20 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Ala

<210> 19
 25 <211> 19
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Ala

<210> 20
 35 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

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

40 Ala Ala Val

<210> 21
 <211> 19

ES 2 714 863 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15

5 Ala Val Ala

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <400> 22

10

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

20 Pro Gly

<210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

25

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Gly Glu

<210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

35

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ala

<210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

40

ES 2 714 863 T3

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

Ala Ala

<210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

5

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Val

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

10

15

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Val Ala

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

20

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

25

Arg

<210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

30

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Pro

<210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <400> 31

35

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

40

Gly

ES 2 714 863 T3

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

5

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Glu

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

10

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

15

Ala

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

20

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15

Ala

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35

30

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Val

<210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

35

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15

40

Ala

<210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

45

ES 2 714 863 T3

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 <210> 38
 5 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 10 1 5 10 15
 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15
 20 <210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 25 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <400> 41
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 35 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 40 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 16
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15
 50 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 44
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15
 <210> 45

ES 2 714 863 T3

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15
 10 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 54
 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15
 20 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 25 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10
 35 <210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 40 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10
 50 <210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 59
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10
 <210> 60

ES 2 714 863 T3

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 5 **Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**
 1 5 10

 <210> 61
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61

 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 15 1 5 10

 <210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 62

 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 25 1 5 10

 <210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 30 **Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**
 1 5 10

 <210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 35 **Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**
 1 5 10

 <210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 65
 45 **Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**
 1 5 10

 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 50 **Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**
 1 5 10

 <210> 67
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 714 863 T3

<400> 67

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

5 <210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 68

10 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

15 <210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 69

20 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

25 <210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 70

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

30 <210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 71

35 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

40 <210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 72

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

45 <210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73

50 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

55 <210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 74

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

ES 2 714 863 T3

<210> 75
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 75

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

 10 <210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 76

 15 **Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**
1 5 10

 20 <210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

 25 <210> 78
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 78

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

 35 <210> 79
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 79

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

 45 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

 50 <210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81

 55 **Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**
1 5 10

 60 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT

ES 2 714 863 T3

<213> Homo sapiens
<400> 82

5 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 83

10 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 84

15 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 85

20 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 86
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 86

25 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 87

30 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 88

35 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89

ES 2 714 863 T3

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10
 <210> 90
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10
 10 <210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 91
 Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10
 20 <210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92
 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 25 1 5 10
 <210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 93
 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10
 35 <210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 94
 40 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10
 <210> 95
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10
 50 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 96
 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10
 <210> 97

ES 2 714 863 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 5 **Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**
 1 5 10

 <210> 98
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98

 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 15 1 5 10

 <210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 99

 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 25 1 5 10

 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 100

 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 30 1 5 10

 <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 101

 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 40 1 5 10

 <210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 45
 Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10

 <210> 103
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 103

 Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 55 1 5 10

 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

5 <210> 105
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 105

10 Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

15 <210> 106
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 106

20 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

25 <210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 107

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5 10

30 <210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 108

35 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

40 <210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 109

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

45 <210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 110

50 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

55 <210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 111

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 112

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

 <210> 113
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 15 **1 5 10**

 <210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 114

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

 25 <210> 115
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 115
 30
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

 <210> 116
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 116

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 40 **1 5 10**

 <210> 117
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 117

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

 <210> 118
 50 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 118

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 55 **1 5 10**

 <210> 119
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

<400> 119

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10

5 <210> 120
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 120

10 Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 121
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 121

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
 1 5

20 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 122

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5

30 <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 123

35 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5

<210> 124
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 124

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5

45 <210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 125

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5

55 <210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 126
 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5

<210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 127

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

 10 <210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 128

 15 **Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**
1 5

 <210> 129
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 129

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

 25 <210> 130
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 130

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

 35 <210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 131

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 132

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

 50 <210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 133

 55 **Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**
1 5

 <210> 134
 <211> 9
 60 <212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 134

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

5 <210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 135

10 Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

15 <210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 136

20 Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

25 <210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 137

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

30 <210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 138

35 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

40 <210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 139

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

45 <210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 140

50 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

55 <210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 141

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 142

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

 10 <210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 143

 15 **Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**
1 5

 <210> 144
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 144

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

 25 <210> 145
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 145

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

 35 <210> 146
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 146

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

 <210> 147
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 147

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

 50 <210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 148

 55 **Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**
1 5

 <210> 149
 <211> 8
 60 <212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 149

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

5
<210> 150
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 150

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

15
<210> 151
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 151

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
20 1 5

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<400> 152

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

30
<210> 153
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 153

35 Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

40
<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 154

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr
45 1 5

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
50 <400> 155

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

55
<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 156

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
 1 5
 <210> 157
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 157

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5
 10 <210> 158
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 158

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5
 15 <210> 159
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 159

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5
 25 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 160

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5
 35 <210> 161
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 161

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5
 40 <210> 162
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 162

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5
 50 <210> 163
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 163

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5
 55 <210> 164
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 164

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

5 <210> 165
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 165

10 **Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**
1 5

<210> 166
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 166

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

20 <210> 167
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 167

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

30 <210> 168
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 168

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

35 <210> 169
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 169

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

45 <210> 170
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 170

50 **Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**
1 5

<210> 171
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 171

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 172

Gly Ala Gln Phe Ser Lys
1 5

 10 <210> 173
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 173

 15 **Ala Gln Phe Ser Lys Thr**
1 5

 20 <210> 174
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 174

Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

 25 <210> 175
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 175

Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

 35 <210> 176
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 176

Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

 40 <210> 177
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 177

Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

 50 <210> 178
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 178

 55 **Thr Ala Ala Lys Gly Glu**
1 5

 <210> 179
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 179

 5 **Ala Ala Lys Gly Glu Ala**
 1 5

 <210> 180
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 180

 Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5

 15 <210> 181
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 181
 20 **Lys Gly Glu Ala Ala Ala**
 1 5

 <210> 182
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 182

 Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5
 30 <210> 183
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 183

 Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5

 40 <210> 184
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 184

 Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 45 1 5

 <210> 185
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 185

 Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5

 55 <210> 186
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 186
 60

Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5
 5 <210> 187
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 187
Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 10 1 5
 <210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 188
Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5
 20 <210> 189
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 189
Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5
 30 <210> 190
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 190
Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5
 35 <210> 191
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 191
Gly Ala Gln Phe Ser
 1 5
 45 <210> 192
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 192
Ala Gln Phe Ser Lys
 50 1 5
 <210> 193
 <211> 5
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 193
Gln Phe Ser Lys Thr
 1 5

<210> 194
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 194

Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 195
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 195

Ser Lys Thr Ala Ala
 15 **1 5**

<210> 196
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 196

Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 197
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 197
 25
 30 **Thr Ala Ala Lys Gly**
1 5

<210> 198
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 198
 35

Ala Ala Lys Gly Glu
 40 **1 5**

<210> 199
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 199
 45

Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 200
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 200
 50

Lys Gly Glu Ala Ala
 55 **1 5**

<210> 201
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 201

Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

5 <210> 202
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 202

10 **Glu Ala Ala Ala Glu**
1 5

<210> 203
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 203

15

Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

20

<210> 204
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 204

25

Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

30

<210> 205
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 205

35 **Ala Glu Arg Pro Gly**
1 5

<210> 206
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 206

40

Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

45

<210> 207
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 207

50 **Arg Pro Gly Glu Ala**
1 5

<210> 208
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 208

55

Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 209
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 209

5

Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 210
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 210

10

Glu Ala Ala Val Ala
1 5

15

<210> 211
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 211

20

Gly Ala Gln Phe
1

25

<210> 212
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 212

30

Ala Gln Phe Ser
1

35

<210> 213
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 213

40

Gln Phe Ser Lys
1

45

<210> 214
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 214

50

Phe Ser Lys Thr
1

55

<210> 215
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 215

60

Ser Lys Thr Ala
1

<210> 216
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 216
Lys Thr Ala Ala
1

5 <210> 217
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 217

10 **Thr Ala Ala Lys**
1

15 <210> 218
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 218

20 **Ala Ala Lys Gly**
1

25 <210> 219
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 219

30 **Ala Lys Gly Glu**
1

35 <210> 220
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 220

40 **Lys Gly Glu Ala**
1

45 <210> 221
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 221

50 **Gly Glu Ala Ala**
1

55 <210> 222
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 222

60 **Glu Ala Ala Ala**
1

65 <210> 223
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 223

70 **Ala Ala Ala Glu**
1

75 <210> 224

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 224
 5 **Ala Ala Glu Arg**
 1

 <210> 225
 <211> 4
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 225

 Ala Glu Arg Pro
 1
 15
 <210> 226
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 226

 Glu Arg Pro Gly
 1

 <210> 227
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 227

 Arg Pro Gly Glu
 1
 30
 <210> 228
 <211> 4
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 228

 Pro Gly Glu Ala
 1
 40
 <210> 229
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 229
 45
 Gly Glu Ala Ala
 1

 <210> 230
 <211> 4
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 230

 Glu Ala Ala Val
 1
 55
 <210> 231
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 231

Ala Ala Val Ala

1

- 5 <210> 232
- <211> 24
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> péptido de control de sentido erróneo RNS
- 10 <400> 232

Gly Thr Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ala Gly Ala Glu Val Lys Arg Ala
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Lys Gln Ala Phe
20

- 15 <210> 233
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> péptido de control de sentido erróneo RNS2
- 20 <400> 233

Gly Lys Ala Ser Gln Phe Ala Lys Thr Ala
1 5 10

- 25 <210> 234
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> fragmento de péptido MANS mutado
- 30 <400> 234

Arg Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

- 35 <210> 235
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> fragmento de péptido MANS mutado
- 40 <400> 235

Arg Ala Lys Gly Glu
1 5

- 45 <210> 236
- <211> 1885
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 50 <222> (309)..(1307)
- <400> 236

ES 2 714 863 T3

tttattactt cttttttttt cgaactacac ttgggctcct ttttttgtgc tcgacttttc	60
cacccttttt ccctccctcc tgtgctgctg ctttttgatc tcttcgacta aaattttttt	120
atccggagtg tatttaatcg gttctgttct gtcctctcca ccacccccac ccccctcct	180
ccggtgtgtg tgccgctgcc gctgttgccg ccgcccgtgc tgctgctgct cgccccgtcg	240
ttacaccaac ccgaggctct ttgtttcccc tcttgatct gttgagtttc tttgttgaag	300
aagccagc atg ggt gcc cag ttc tcc aag acc gca gcg aag gga gaa gcc	350
Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala	
1 5 10	
gcc gcg gag agg cct ggg gag gcg gct gtg gcc tcg tcg cct tcc aaa	398
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys	
15 20 25 30	
gcg aac gga cag gag aat ggc cac gtg aag gta aac ggc gac gct tcg	446
Ala Asn Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser	
35 40 45	
ccc gcg gcc gcc gag tcg ggc gcc aag gag gag ctg cag gcc aac ggc	494
Pro Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly	
50 55 60	
agc gcc ccg gcc gcc gac aag gag gag ccc gcg gcc gcc ggg agc ggg	542
Ser Ala Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly	
65 70 75	
gcg gcg tcg ccc tcc gcg gcc gag aaa ggt gag ccg gcc gcc gcc gct	590
Ala Ala Ser Pro Ser Ala Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala	
80 85 90	
gcc ccc gag gcc ggg gcc agc ccg gta gag aag gag gcc ccc gcg gaa	638
Ala Pro Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu	
95 100 105 110	
ggc gag gct gcc gag ccc ggc tcg ccc acg gcc gcg gag gga gag gcc	686
Gly Glu Ala Ala Glu Pro Gly Ser Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala	
115 120 125	
gcg tcg gcc gcc tcc tcg act tct tcg ccc aag gcc gag gac ggg gcc	734
Ala Ser Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala	
130 135 140	
acg ccc tcg ccc agc aac gag acc ccg aaa aaa aaa aag aag cgc ttt	782
Thr Pro Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe	
145 150 155	
tcc ttc aag aag tct ttc aag ctg agc ggc ttc tcc ttc aag aag aac	830
Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn	
160 165 170	
aag aag gag gct gga gaa ggc ggt gag gct gag gcg ccc gct gcc gaa	878
Lys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu	
175 180 185 190	
ggc gcc aag gac gag gcc gcc ggg ggc gca gct gcg gcc gcc gcc gag	926
Gly Gly Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Glu	

ES 2 714 863 T3

	195	200	205	
	gcg ggc gcg gcc tcc ggg gag cag gca gcg gcg ccg ggc gag gag gca			974
	Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala			
	210	215	220	
	gca gcg ggc gag gag ggg gcg gcg ggt ggc gac tcg cag gag gcc aag			1022
	Ala Ala Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gln Glu Ala Lys			
	225	230	235	
	ccc cag gag gcc gct gtc gcg cca gag aag ccg ccc gcc agc gac gag			1070
	Pro Gln Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu			
	240	245	250	
	acc aag gcc gcc gag gag ccc agc aag gtg gag gag aaa aag gcc gag			1118
	Thr Lys Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu			
	255	260	265	270
	gag gcc ggg gcc agc gcc gcc gcc tgc gag gcc ccc tcc gcc gcc ggg			1166
	Glu Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly			
	275	280	285	
	ctg gtg tgc ccc cgg aga gga ggc agc ccc cgc gga gga gcc cgc ggc			1214
	Leu Val Cys Pro Arg Arg Gly Gly Ser Pro Arg Gly Gly Ala Arg Gly			
	290	295	300	
	cgc cgc agc ctc aat caa gcc tgc gca gcc ccc tca cag gag gcc cag			1262
	Arg Arg Ser Leu Asn Gln Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln			
	305	310	315	
	ccc gag tgc agt cca gaa gcc ccc cca gcg gag gcg gca gag taa			1307
	Pro Glu Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu			
	320	325	330	
	aagagcaagc ttttgtgaga taatcgaaga acattttctc ccccgtttgt ttggttgag			1367
	tggtgccagg tactggattt tggagaactt gtctacaacc agggattgat tttaaagatg			1427
	tcttttttta ttttactttt ttttaagcac caaattttgt tgtttttttt ttctcccctc			1487
	cccacagatc ccatctcaaa tcattctggt aaccaccatt ccaacaggtc gaggagagct			1547
	taaacacctt cttcctctgg ccttgtttct cttttatttt ttattttttc gcatcagtat			1607
	taatgttttt gcatactttg catctttatt caaaagtgta aactttcttt gtcaatctat			1667
	ggacatgccc atatatgaag gagatgggtg ggtcaaaaag ggatatcaaa tgaagtgata			1727
	ggggtcacia tggggaaatt gaagtgggtgc ataacattgc caaaatagtg tgccactaga			1787
	aatggtgtaa aggctgtcct tttttttttt tttaaagaaa agttattacc atgtattttg			1847
	tgaggcaggt ttacaacact acaactcgtg ccgaattc			1885

5 <210> 237
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 237

10 Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala

ES 2 714 863 T3

1				5						10					15
Glu	Arg	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn
			20					25					30		
Gly	Gln	Glu	Asn	Gly	His	Val	Lys	Val	Asn	Gly	Asp	Ala	Ser	Pro	Ala
		35					40					45			
Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala
	50					55					60				
Pro	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Ala
65					70					75					80
Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro
				85					90					95	
Glu	Ala	Gly	Ala	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Glu
			100					105					110		
Ala	Ala	Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Ala	Ser
		115					120					125			
Ala	Ala	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Ala	Glu	Asp	Gly	Ala	Thr	Pro
	130					135					140				
Ser	Pro	Ser	Asn	Glu	Thr	Pro	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Phe	Ser	Phe
145					150						155				160
Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Lys	Lys	Asn	Lys	Lys
				165					170					175	
Glu	Ala	Gly	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Glu	Ala	Pro	Ala	Ala	Glu	Gly	Gly
			180					185					190		
Lys	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly
		195					200					205			
Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala
	210					215					220				
Gly	Glu	Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Pro	Gln
225					230					235					240
Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Glu	Lys	Pro	Pro	Ala	Ser	Asp	Glu	Thr	Lys
				245					250					255	

ES 2 714 863 T3

Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu Glu Ala
 260 265 270

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Leu Val
 275 280 285

Cys Pro Arg Arg Gly Gly Ser Pro Arg Gly Gly Ala Arg Gly Arg Arg
 290 295 300

Ser Leu Asn Gln Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln Pro Glu
 305 310 315 320

Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu
 325 330

- 5 <210> 238
- <211> 2589
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (370)..(1368)
- <400> 238

```

caaccaggga gatttctcca ttttcctctt gtctacagtg cggctacaaa tctgggattt      60
ttttattact tctttttttt tcgaactaca cttgggctcc tttttttgtg ctcgactttt      120
ccaccctttt tccctccctc ctgtgctgct gctttttgat ctcttcgact aaaatttttt      180
tatccggagt gtatttaatc ggttctgttc tgtcctctcc accaccccca cccccctccc      240
tccgggtgtgt gtgccgctgc cgctgttgcc gccgccgctg ctgctgctgc tcgccccgtc      300
gttacaccaa cccgaggctc tttgtttccc ctcttgatc tgttgagttt ctttgttgaa      360
gaagccagc atg ggt gcc cag ttc tcc aag acc gca gcg aag gga gaa gcc      411
      Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
      1          5          10
gcc gcg gag agg cct ggg gag gcg gct gtg gcc tcg tcg cct tcc aaa      459
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys
15          20          25          30
gcg aac gga cag gag aat ggc cac gtg aag gta aac ggc gac gct tcg      507
Ala Asn Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser
35          40          45
ccc gcg gcc gcc gag tcg ggc gcc aag gag gag ctg cag gcc aac ggc      555
Pro Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly
50          55          60
agc gcc ccg gcc gcc gac aag gag gag ccc gcg gcc gcc ggg agc ggg      603
Ser Ala Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly
65          70          75
    
```

ES 2 714 863 T3

gcg gcg tcg ccc tcc tcg gcc gag aaa ggt gag ccg gcc gcc gcc gct Ala Ala Ser Pro Ser Ser Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala 80 85 90	651
gcc ccc gag gcc ggg gcc agc ccg gta gag aag gag gcc ccc gcg gaa Ala Pro Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu 95 100 105 110	699
ggc gag gct gcc gag ccc ggc tcg gcc acg gcc gcg gag gga gag gcc Gly Glu Ala Ala Glu Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala 115 120 125	747
gcg tcg gcc gcc tcc tcg act tct tcg ccc aag gcc gag gac ggg gcc Ala Ser Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala 130 135 140	795
acg ccc tcg ccc agc aac gag acc ccg aaa aaa aaa aag aag cgc ttt Thr Pro Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe 145 150 155	843
tcc ttc aag aag tct ttc aag ctg agc ggc ttc tcc ttc aag aag aac Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn 160 165 170	891
aag aag gag gct gga gaa ggc ggt gag gct gag gcg ccc gct gcc gaa Lys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu 175 180 185 190	939
ggc ggc aag gac gag gcc gcc ggg ggc gca gct gcg gcc gcc gcc gag Gly Gly Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu 195 200 205	987
gcg ggc gcg gcc tcc ggg gag cag gca gcg gcg ccg ggc gag gag gcg Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala 210 215 220	1035
gca gcg ggc gag gag ggg gcg gcg ggt ggc gac ccg cag gag gcc aag Ala Ala Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Pro Gln Glu Ala Lys 225 230 235	1083
ccc cag gag gcc gct gtc gcg cca gag aag ccg ccc gcc agc gac gag Pro Gln Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu 240 245 250	1131
acc aag gcc gcc gag gag ccc agc aag gtg gag gag aaa aag gcc gag Thr Lys Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu 255 260 265 270	1179
gag gcc ggg gcc agc gcc gcc gcc tgc gag gcc ccc tcc gcc gcc ggg Glu Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly 275 280 285	1227
ccc ggc gcg ccc ccg gag cag gag gca gcc ccc gcg gag gag ccc gcg Pro Gly Ala Pro Pro Glu Gln Glu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Pro Ala 290 295 300	1275
gcc gcc gca gcc tcg tca gcc tgc gca gcc ccc tca cag gag gcc cag Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln 305 310 315	1323
ccc gag tgc agt cca gaa gcc ccc cca gcg gag gcg gca gag taa Pro Glu Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu 320 325 330	1368

ES 2 714 863 T3

aagagcaagc ttttgtgaga taatcgaaga acttttctcc cccgtttggt tgttgagtg 1428
 gtgccaggta ctgttttgga gaacttgtct acaaccaggg attgatttta aagatgtctt 1488
 tttttatfff actttttfff aagcaccaaa ttttgttggt tttttttttc tcccctcccc 1548
 acagatccca tctcaaatca ttctgttaac caccattcca acaggtcgag gagagcttaa 1608
 acaccttctt cctctgcctt gtttctcttt tattttttat tttttcgcat cagtattaat 1668
 gtttttgcac actttgcatc tttattcaaa agtgtaaact ttctttgtca atctatggac 1728
 atgcccatat atgaaggaga tgggtgggtc aaaaagggat atcaaatgaa gtgatagggg 1788
 tcacaatggg gaaattgaag tgggtcataa cattgccaaa atagtgtgcc actagaaatg 1848
 gtgtaaaggc tgtctttttt ttttttttta aagaaaagtt attaccatgt attttgtgag 1908
 gcaggtttac aacctactaa gtcttgagtt aagaaggaaa gaggaaaaaa gaaaaaacac 1968
 caataccagc atttaaaaaa aaaaaaacga tcatagtctt aggagtcat ttaaaccata 2028
 ggaacttttc acttatctca tgtagctgt accagtcagt gattaagtag aactacaagt 2088
 tgtataggct ttattgttta ttgctggttt atgaccttaa taaagtgtaa ttatgtatta 2148
 ccagcagggt gtttttaact gtgactattg tataaaaaaca aatcttgata tccagaagca 2208
 catgaagttt gcaactttcc accctgcccc tttttgtaa actgcagtca tcttgacct 2268
 tttaaaacac aaatttttaa ctcaaccaag ctgtgataag tggaatggtt actgtttata 2328
 ctgtggtatg tttttgatta cagcagataa tgctttcttt tccagtcgtc tttgagaata 2388
 aaggaaaaaa aatcttcaga tgcaatggtt ttgtgtagca tcttgtctat catgttttgt 2448
 aaatactgga gaagctttga ccaatttgac ttagagatgg aatgtaactt tgcttaciaa 2508
 aattgctatt aaactcctgc ttaaggtggt ctaattttct gtgagcacac taaaagcgaa 2568
 aaataaatgt gaataaaatg t 2589

<210> 239
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 239

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

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys Ala Asn
 20 25 30

Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser Pro Ala
 35 40 45

5

10

ES 2 714 863 T3

Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly Ser Ala
50 55 60

Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Ala
65 70 75 80

Ser Pro Ser Ser Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Pro
85 90 95

Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu Gly Glu
100 105 110

Ala Ala Glu Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala Ala Ser
115 120 125

Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala Thr Pro
130 135 140

Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe
145 150 155 160

Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys
165 170 175

Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu Gly Gly
180 185 190

Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ala Gly
195 200 205

Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala Ala Ala
210 215 220

Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Pro Gln Glu Ala Lys Pro Gln
225 230 235 240

Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu Thr Lys
245 250 255

Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu Glu Ala
260 265 270

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Pro Gly
275 280 285

Ala Pro Pro Glu Gln Glu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ala
290 295 300

ES 2 714 863 T3

Ala Ala Ser Ser Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln Pro Glu
305 310 315 320

Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu
325 330

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto inhibidor de MARCKS para usar en un método para inhibir la metástasis de células cancerosas, en el que el compuesto inhibidor de MARCKS es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 231, la SEQ ID NO: 234, y SEQ ID NO: 235; en el que el aminoácido N-terminal y/o de terminal C de la secuencia peptídica se modifica químicamente.
- 10 2. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de la reivindicación 1, en el que el aminoácido de terminal N del péptido se modifica químicamente por acilación del aminoácido de terminal N del péptido en la forma de una amida seleccionada de grupo que consiste en:
- 15 una amida de un ácido carboxílico C₂ (acetilo) a C₂₄ alifático que puede ser lineal, ramificada, saturada o insaturada,
- una amida de ácido trifluoroacético,
- una amida de ácido benzoico y
- 20 una amida de un ácido alquil sulfónico C₁ a C₂₄ alifático; o
- el grupo amina de terminal N del aminoácido de terminal N del péptido se puede alquilar con un grupo seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 un grupo alquilo alifático C₁ a C₂₄,
- un grupo 2-(alquilo alifático C₁ a C₂₄) oxietilo lineal,
- un grupo omega-metoxi-poli (etilenoxi) n-etilo, donde n es de 0 a 10.
- 30 3. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de la reivindicación 1 o 2, en el que la amida de terminal N se selecciona del grupo que consiste en acetilo y miristoilo.
4. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aminoácido de terminal C del péptido se modifica químicamente por formación de amida en el grupo de ácido carboxílico de terminal C de la de terminal C aminoácido del péptido en forma de una amida seleccionada del grupo que consiste en:
- 35 una amida de amoníaco,
- 40 una amida de una alquil amina C₁ a C₂₄ alifática,
- una amida de una alquil amina C₂ a C₂₄ alifática sustituida con hidroxilo,
- 45 una amida de un grupo 2-(alquilo C₁ a C₂₄ alifático) oxetilamino lineal y
- una amida de un grupo omega-metoxi-poli (etilenoxi)_n-etilamina, donde n es de 0 a 10.
5. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de la reivindicación 4, en el que el péptido comprende una sustitución de aminoácidos de configuración d.
- 50 6. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de la reivindicación 4, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106); N-miristoil-AKGE (SEQ ID NO: 219); N-miristoil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID NO: 106); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106); N-acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 121); N-miristoil-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 121); N-acetil-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID NO: 106 121); y acetil-GAQFS (d) KTA A (d) K (SEQ ID NO 106).
- 55 7. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en Ac-GAQFSKTAAK-OH (SEQ ID NO: 106), Ma-GAQFSKTAAK-OH (SEQ ID NO: 106), MA-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID NO: 106), Ac-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID NO: 234), Ac-GAQFSKTA A-OH (SEQ ID NO: 121), Ma-RGAQFSKTA A-K (SEQ ID NO: 234), y Ma-AKGE-OH (SEQ ID NO: 219).
- 60 8. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método comprende la administración por inhalación de una solución o suspensión líquida, o por inhalación de una formulación de polvo seco del péptido, o por inyección de una formulación líquida del péptido, o por inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal o por administración oral o de supositorios.
- 65

9. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de la reivindicación 8, en el que la inyección es un tumor que contiene la célula cancerosa.
- 5 10. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de la reivindicación 8, en el que el tumor es un tumor sólido o un tumor no sólido.
- 10 11. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el péptido se administra en una dosis de entre aproximadamente 0.01 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, preferiblemente de entre aproximadamente 0.5 mg/kg/día a 2.5 mg/kg/día.
- 15 12. Un compuesto inhibidor de MARCKS para uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el compuesto inhibidor de MARCKS se proporciona como una formulación que comprende un fármaco adicional útil en el tratamiento del cáncer, preferiblemente en el que el fármaco adicional es una quimioterapia fármaco, preferiblemente en el que el fármaco quimioterapéutico se selecciona de carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, temozolomida, gemcitabina, cladribita, periquitador, clofarabina, cistabina, fletarina, fludarabina, brotinotransparentes, clofarabina, cincarcabina, cincarcabina, flácido epirubicina, idarubicina, topotecán, irinotecán, etopósido, enipósido, colchicina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel.
- 20 13. Un péptido para uso en un método para inhibir la metástasis de una célula cancerosa en un mamífero, en el que el método comprende administrar a dicho mamífero un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, y SEQ ID NO: 235; en el que el aminoácido de terminal N y/o de terminal C de la secuencia peptídica se modifica químicamente, y en el que dicho péptido exhibe un índice de migración de al menos aproximadamente 2.0 después del tratamiento previo de células de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) con una concentración de 100 mmol de dicho péptido y un período de migración de 12 horas.
- 25 14. Un péptido para uso en un método de la reivindicación 13, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en Ac-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO: 106), Ma-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO: 106), MA-GAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO: 106), Ac-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO: 234), Ac-GAQFSKTAA-OH (SEQ ID NO: 121), Ma-RGAQFSKTAACNH₂ (SEQ ID NO: 234) y Ma -AKGE-OH (SEQ ID NO: 219).
- 30

Control negativo (tiempo de migración: 12 horas)

Figura 1

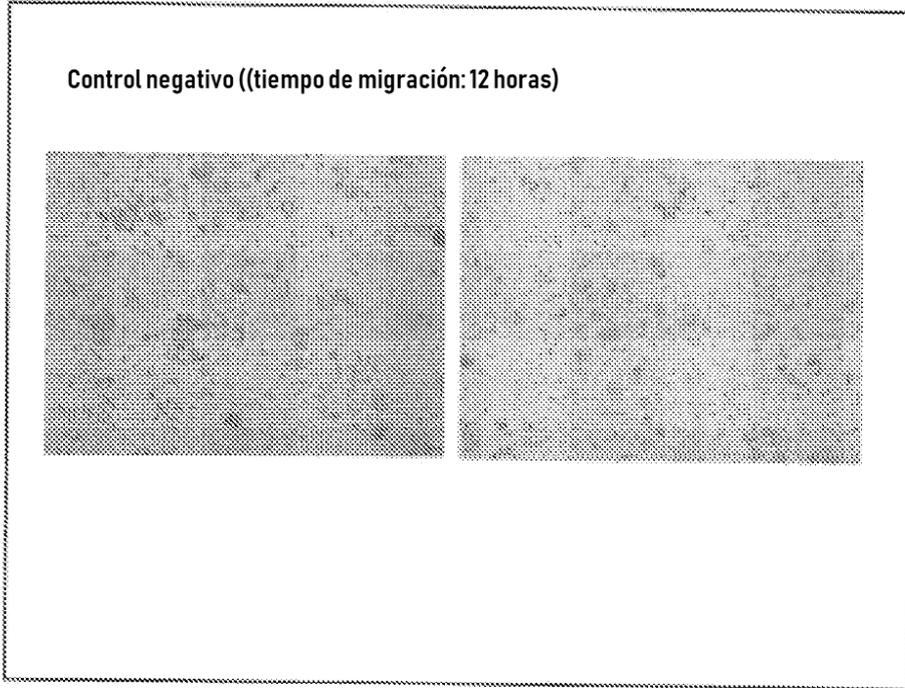


Figura 2A

Figura 2 B

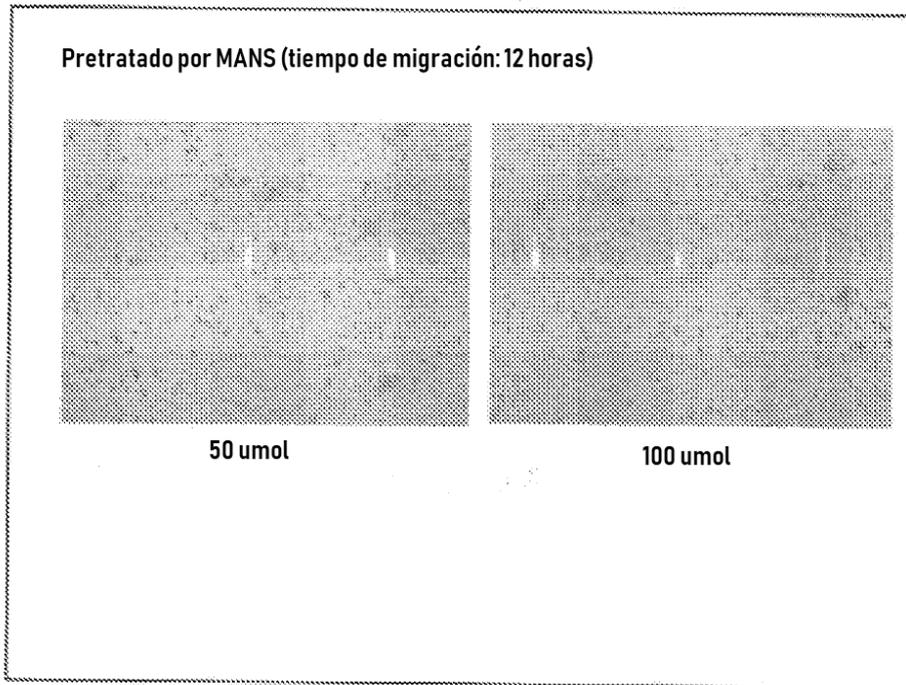


Figura 3A

Figura 3B

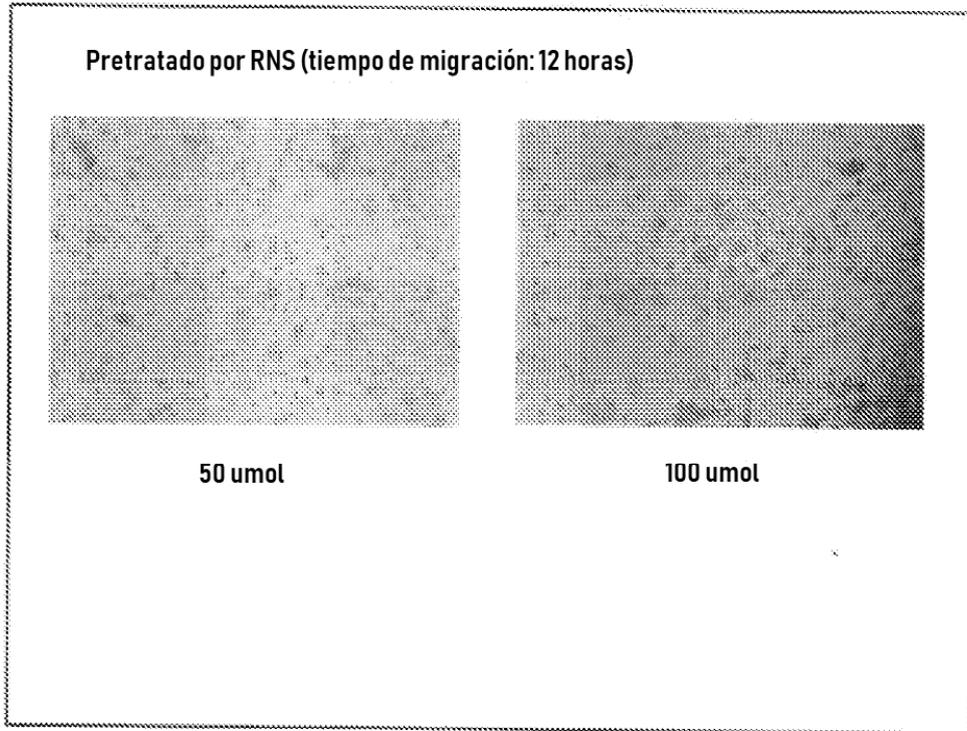


Figura 4A

Figura 4B

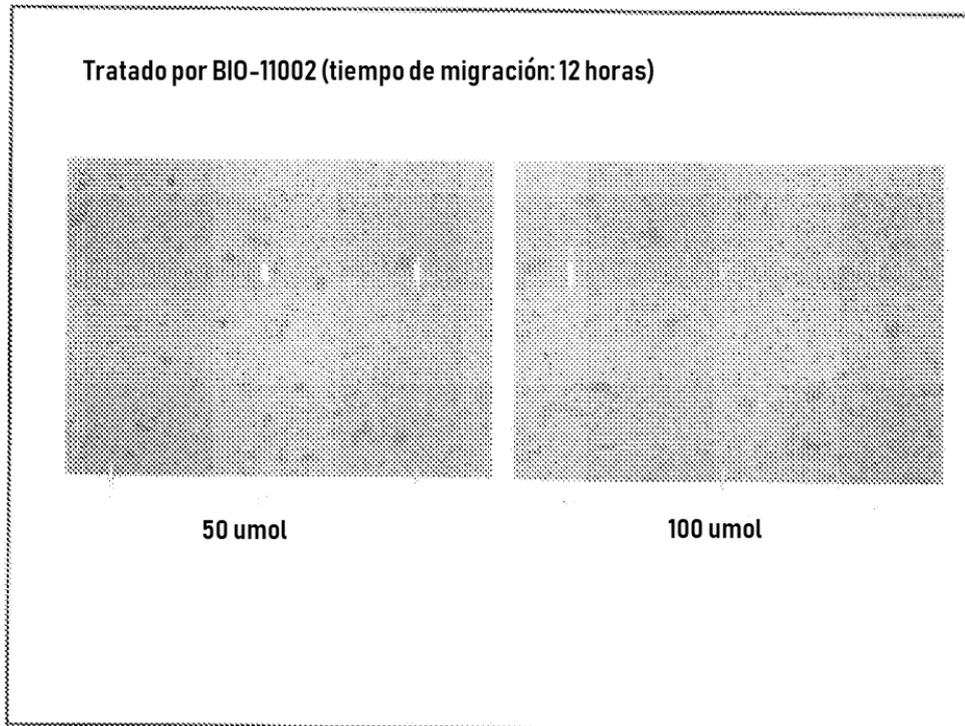


Figura 5A

Figura 5B

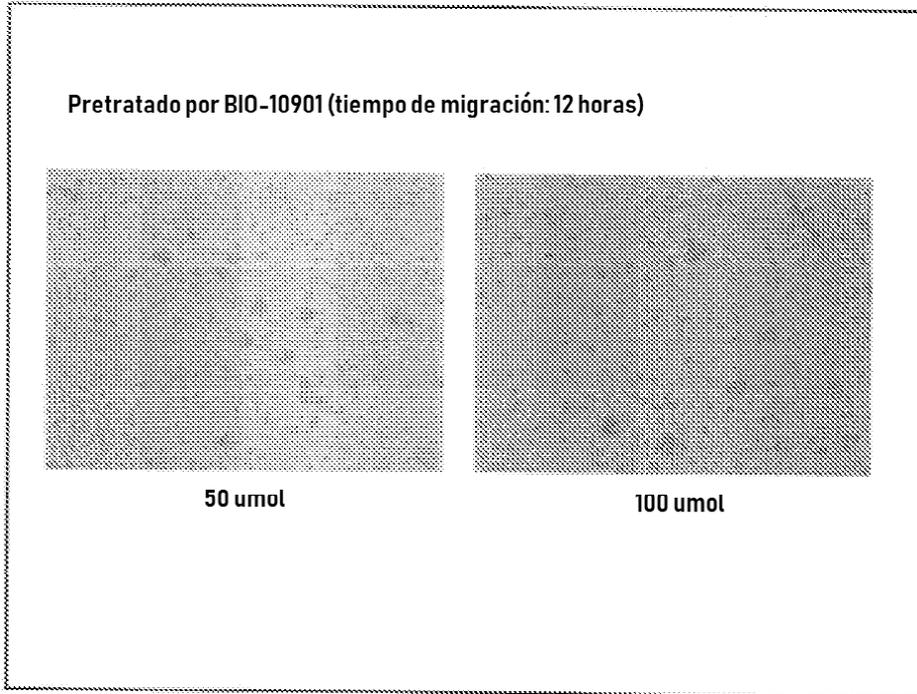


Figura 6A

Figura 6B

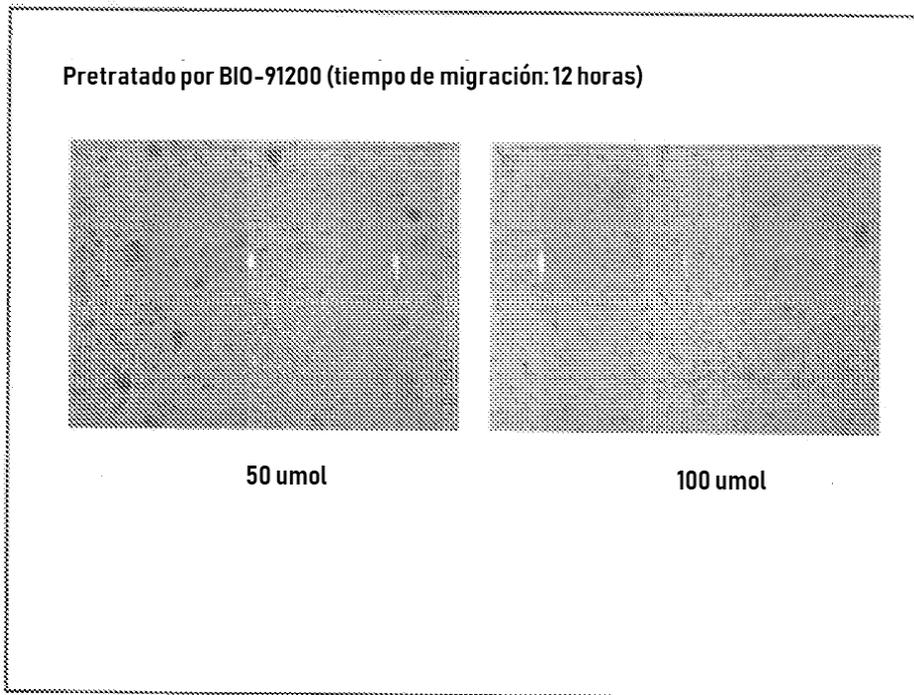


Figura 7A

Figura 7B

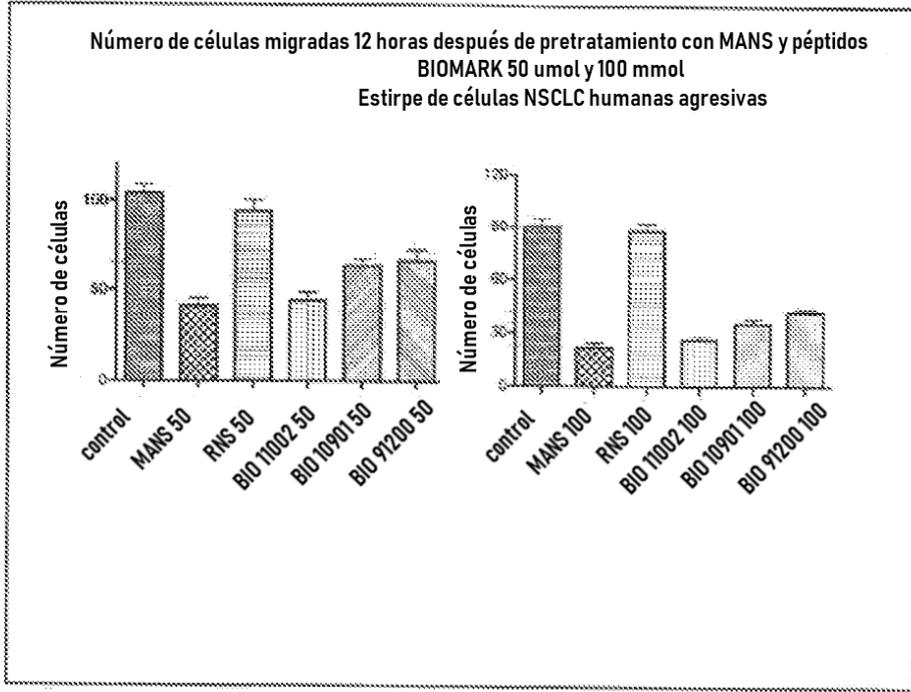


Figura 8A

Figura 8B

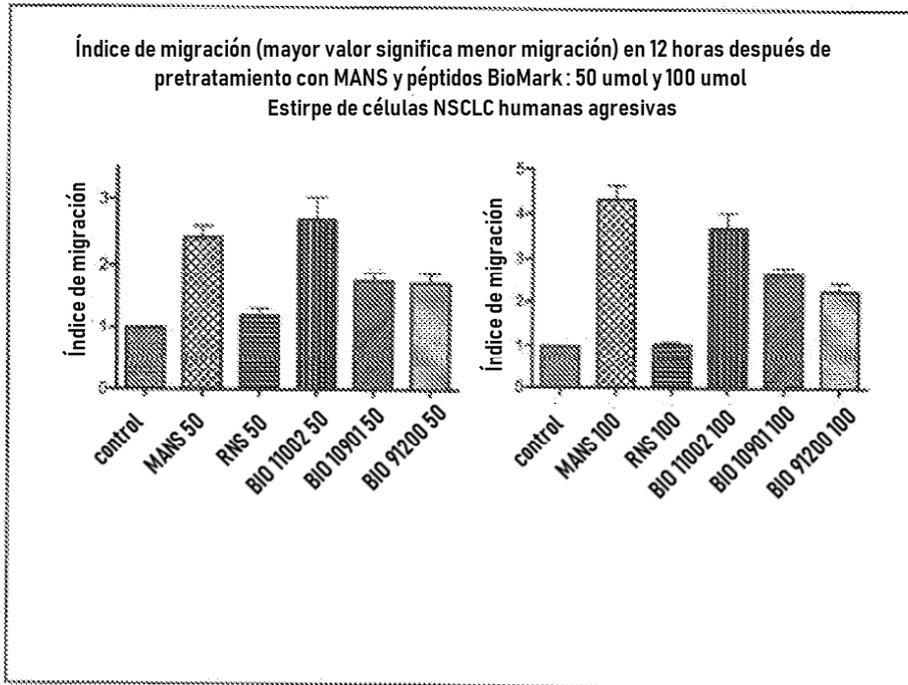


Figura 9

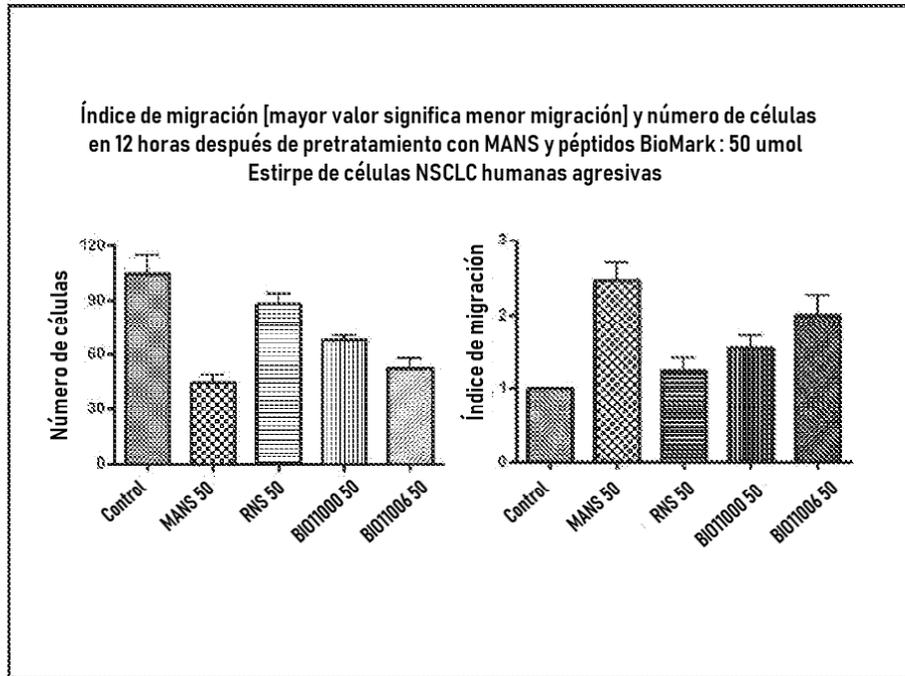


Figura 10

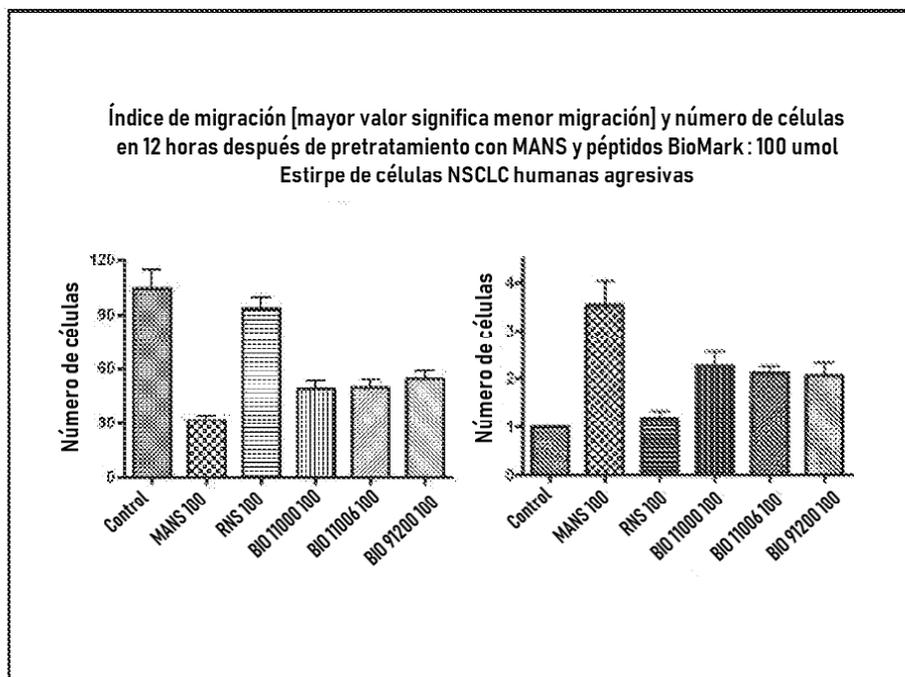


Figura 11 Número de células migradas 12 horas después de pretratamiento con péptidos de prueba, estirpe de células A549

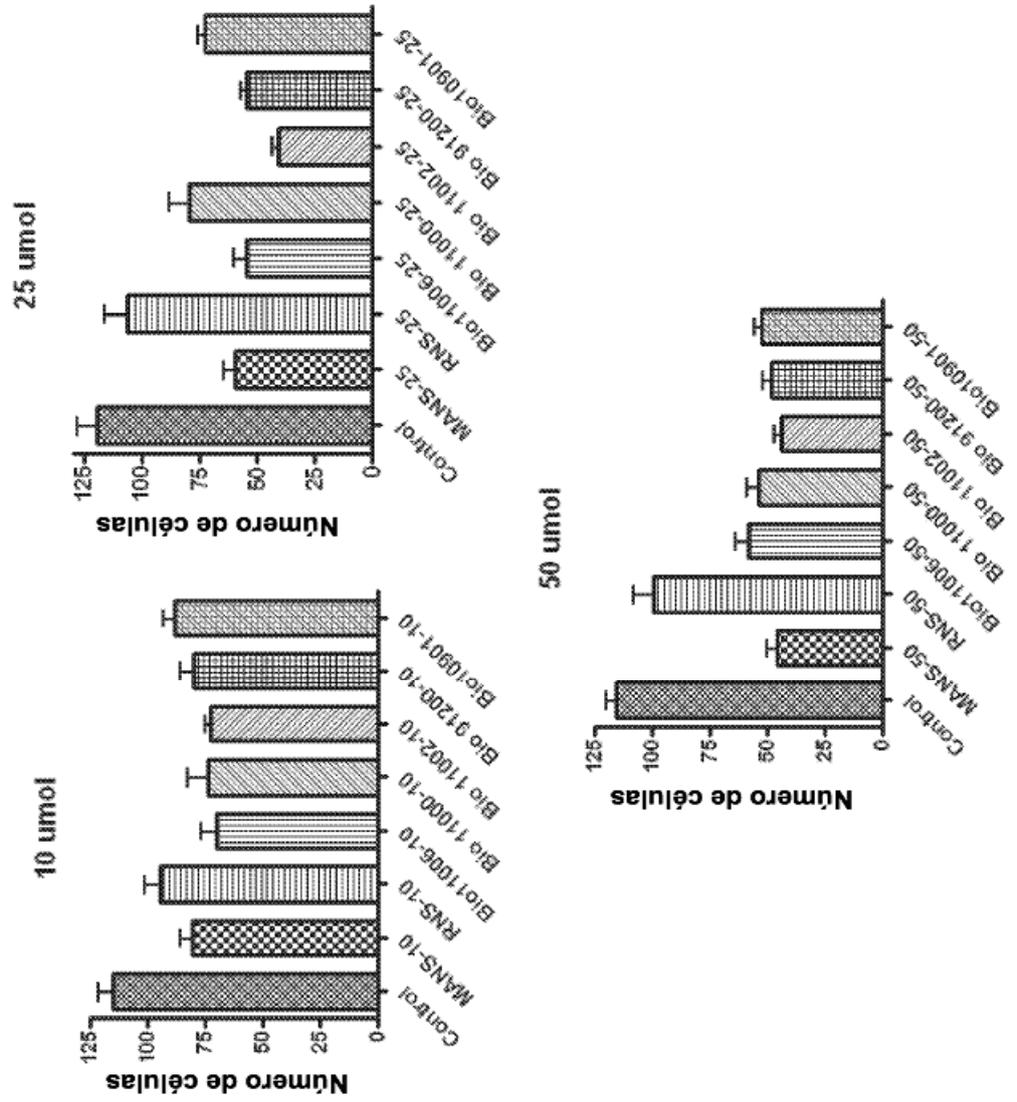


Figura 12

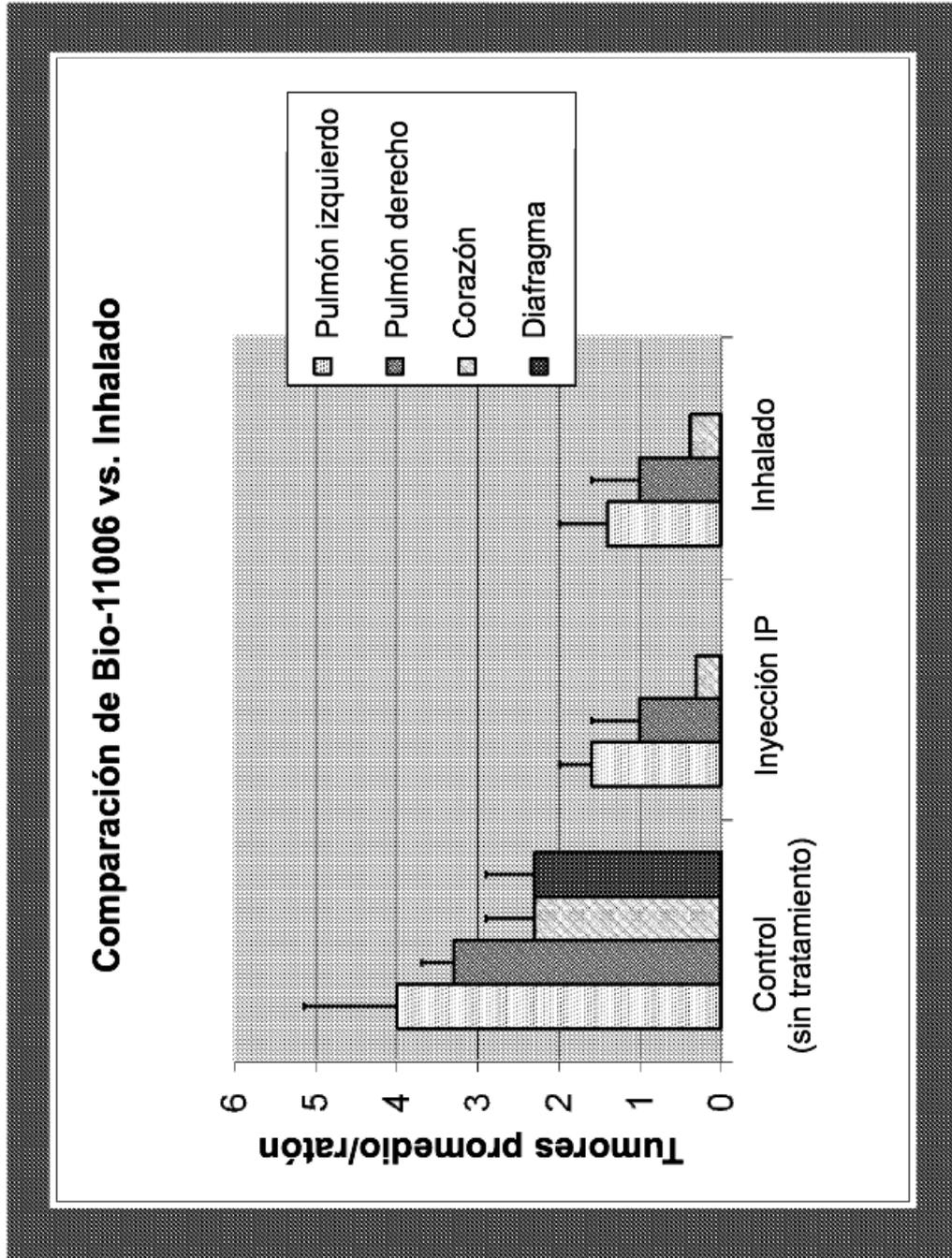


Figura 13

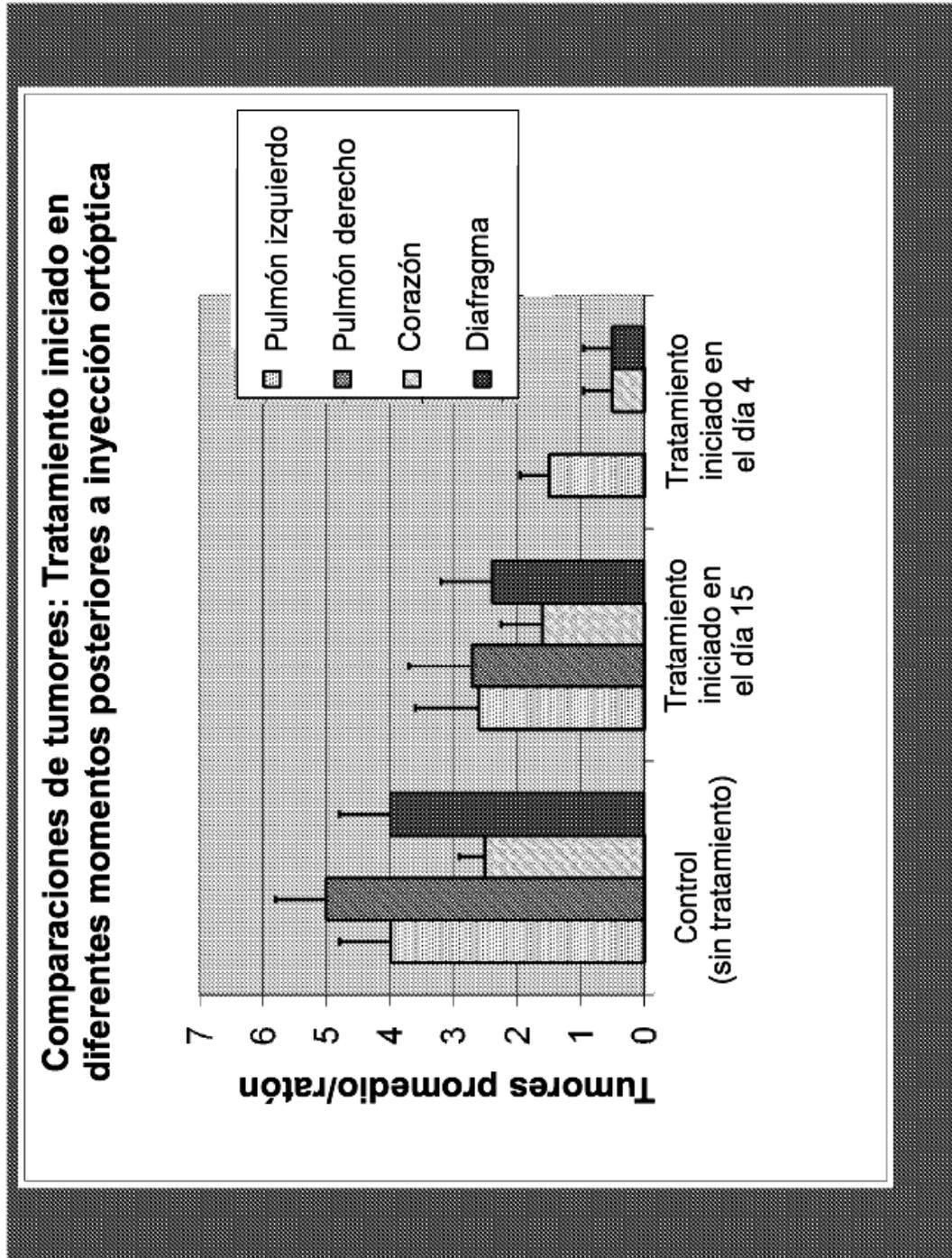


Figura 14

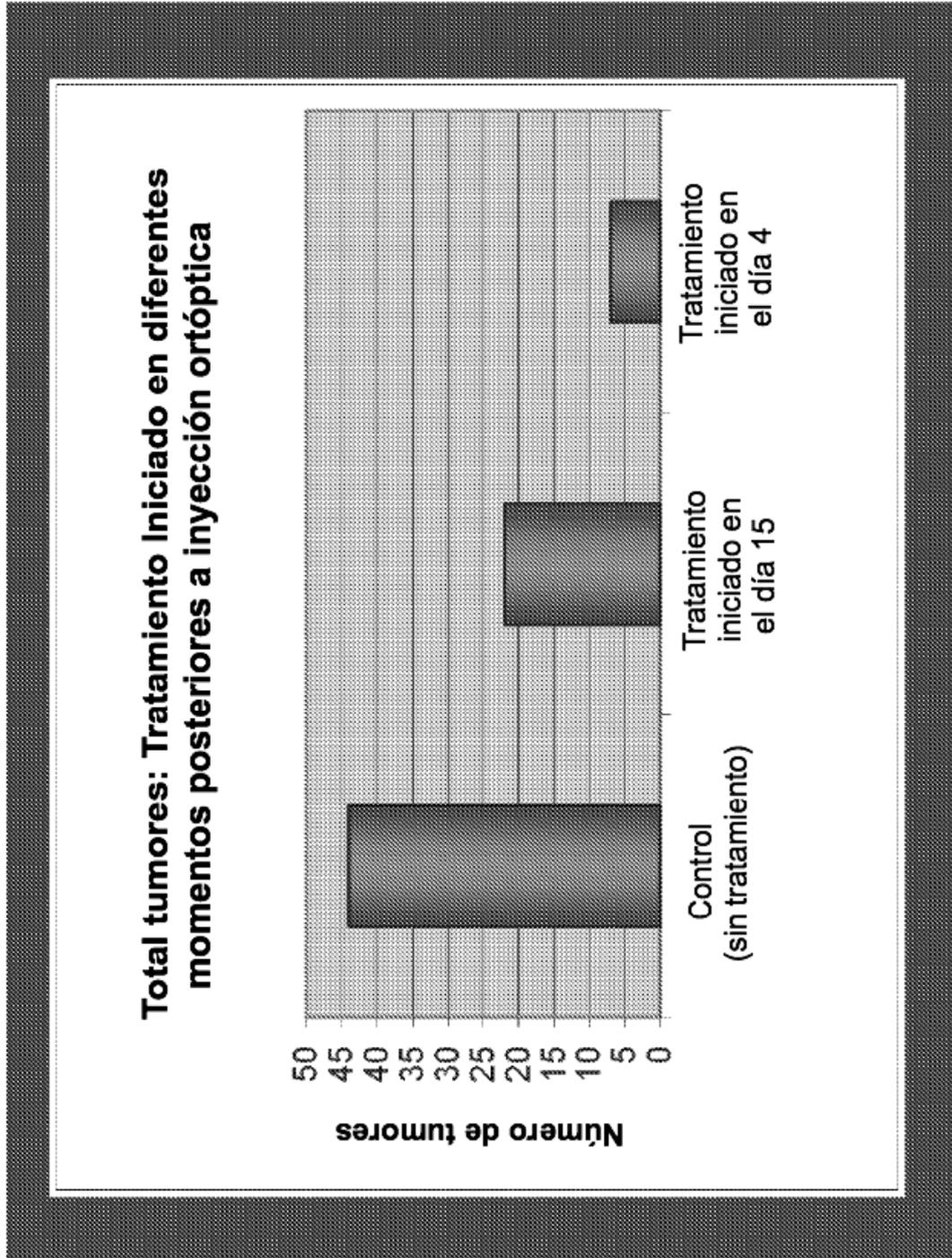
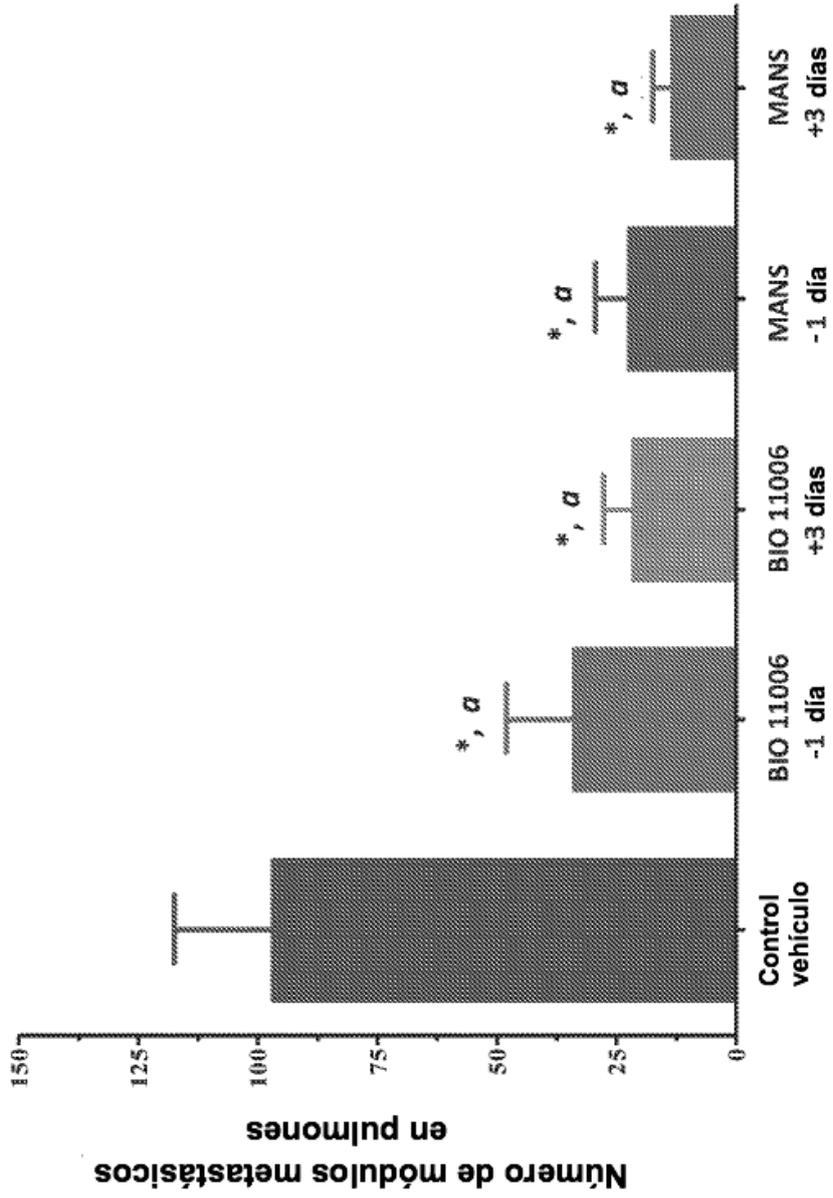


Figura 15
Nódulos de tumor metastásicos en varios grupos de tratamiento



* $p < 0.05$, estadísticamente significativo en comparación con un grupo de control;
 a. estadísticamente no significativo en comparación entre varios grupos

Figura 16

Expresión de proteína MARCKS (eje Y) se reduce ~60% en células PC-9 después de tratamiento con ARNip. Nivel de proteína MARCKS evaluada a través de Western Blot

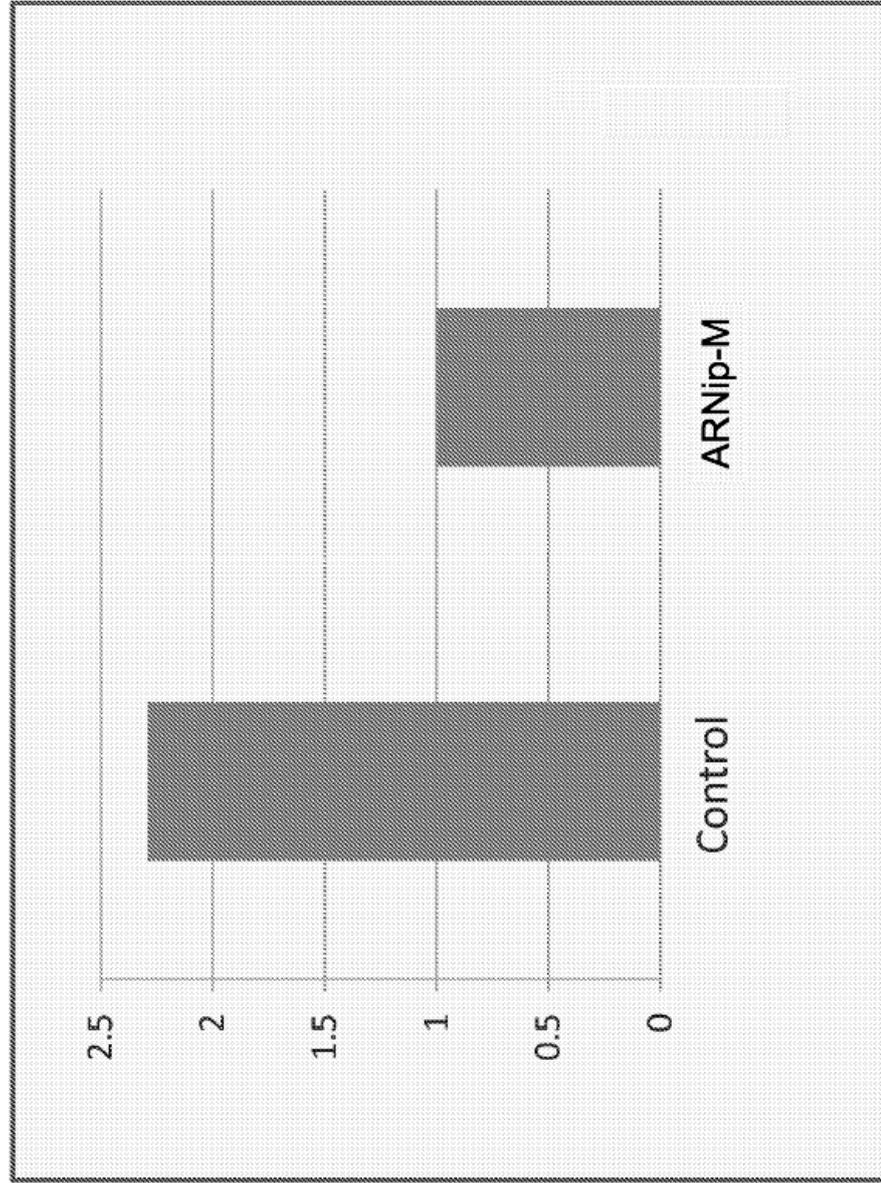


Figura 17
Expresión de proteína MARCKS (eje Y) se reduce ~50% en células A549 después de tratamiento con ARNip. Nivel de proteína MARCKS evaluada a través de Western Blot

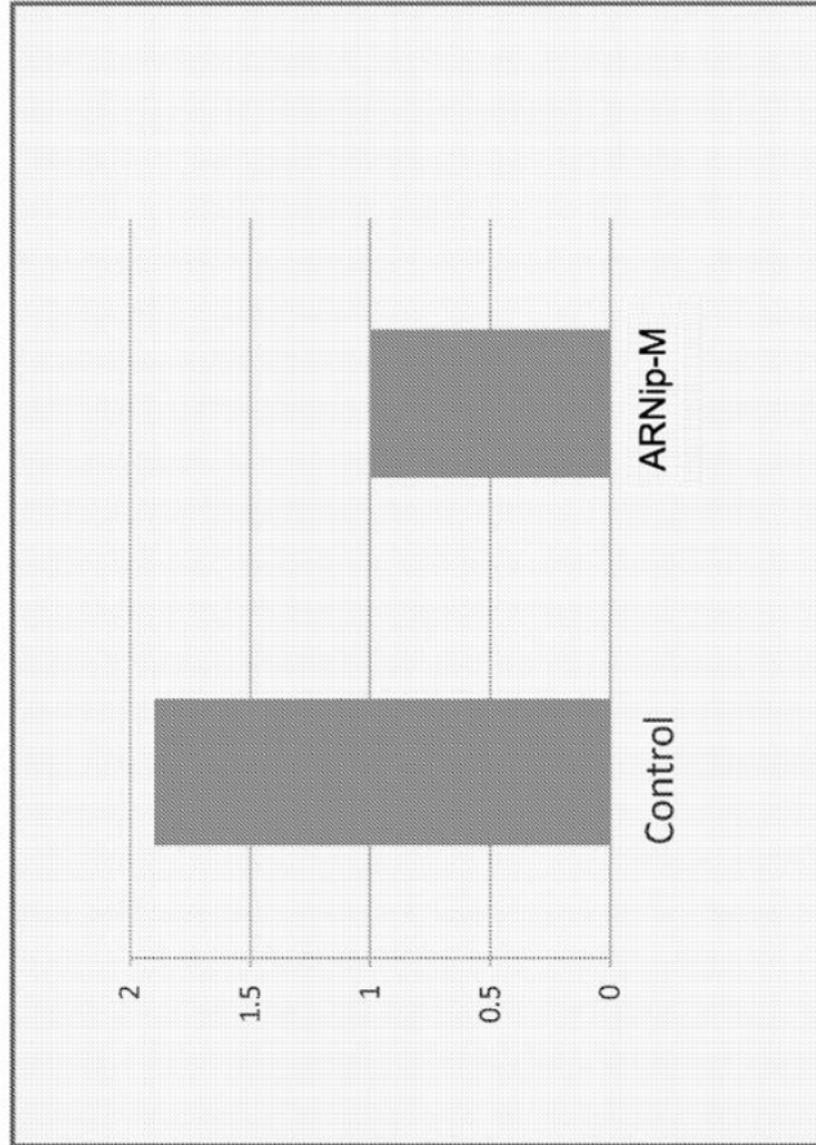


Figura 18

Atenuación de MARCKS en células PC-9 por ARNip MARCKS resulta en ~90% de reducción en migración celular

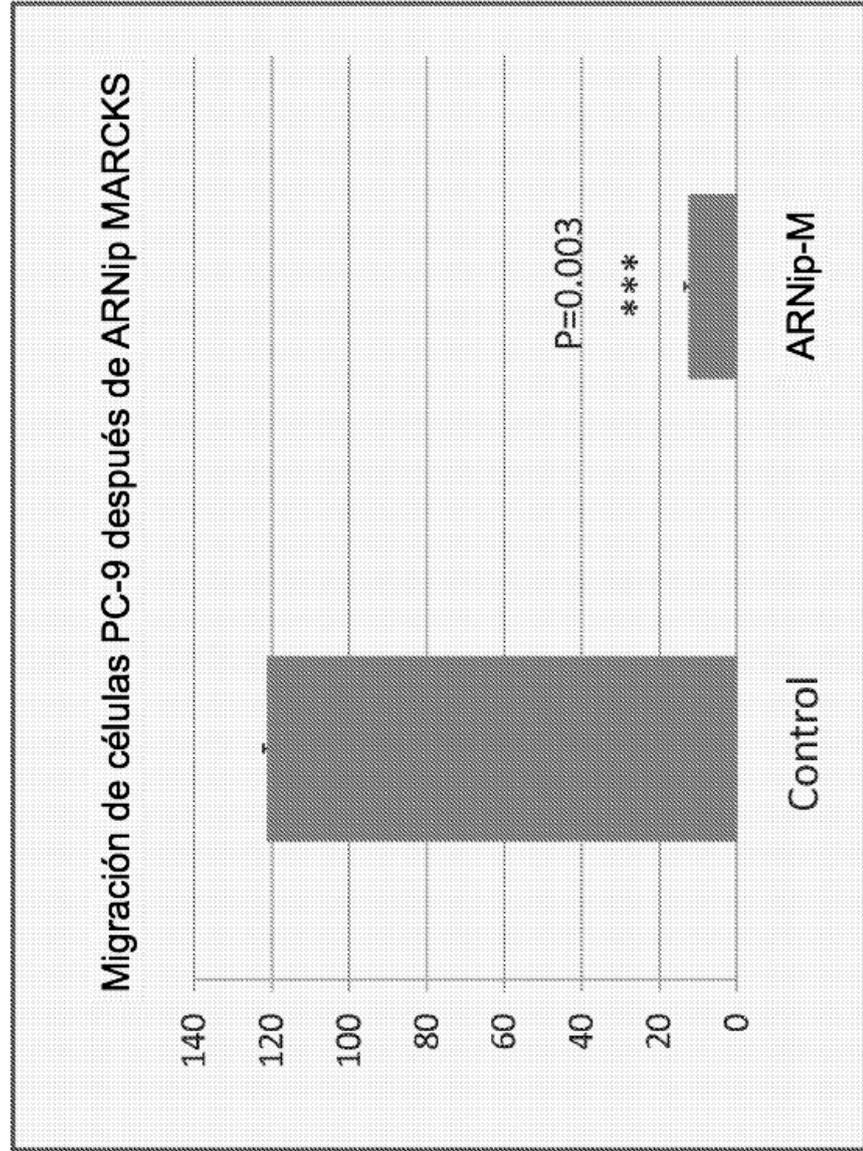


Figura 19
Migración de células A549 después de tratamiento de ARNip MARCKS

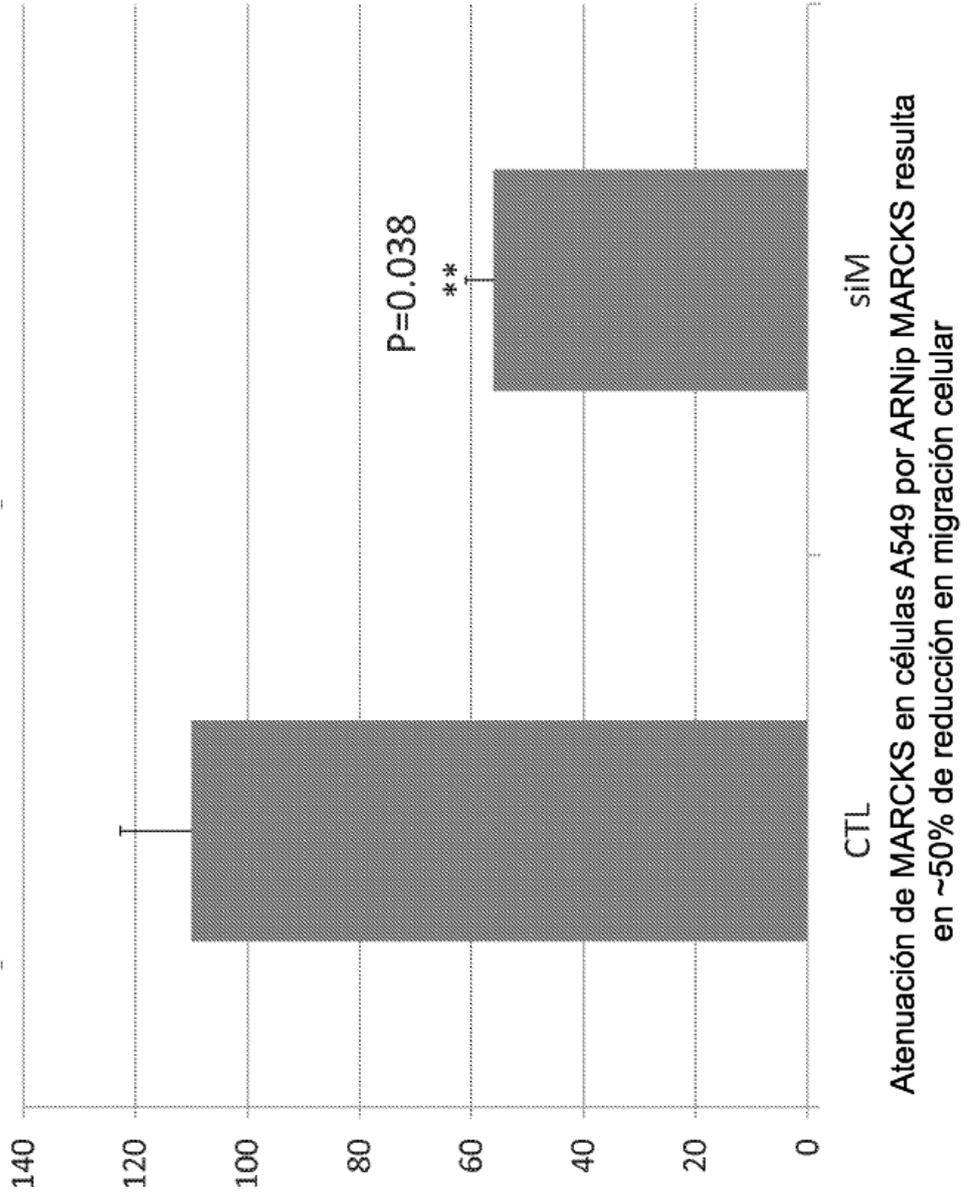
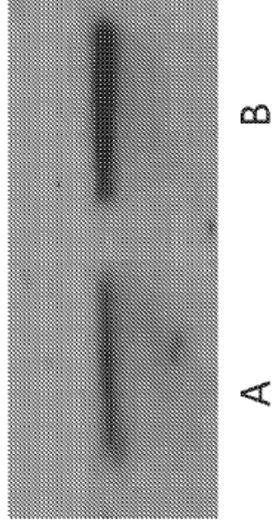


Figura 20



A: Control 50 nM negativo miR-21
B: inhibidor 50 nM miR-21

Se transfectan células PC9 (P15) con 50 nM de control negativo (vehículo HiPerfect) o el inhibidor miR-21. Después de 48 horas, las células se recolectaron y la proteína se analizó por Inmunotransferencia Western con anticuerpo MARCKS.

El inhibidor miR-21 aumenta la expresión de proteína MARCKS en células PC-9 ~ 2.5 veces.

Figura 21

