

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 461**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 21171264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 3919070**

54 Título: **Uso de CD36 para identificar sujetos con cáncer para tratamiento con un péptido Psap**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782850 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.03.2025

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.00%)
55 Shattuck Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

WATNICK, RANDOLPH, S.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 3 007 461 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

Uso de CD36 para identificar sujetos con cáncer para tratamiento con un péptido Psap

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/782.850, presentada el 14 de marzo de 2013.

Investigación o desarrollo patrocinado federalmente

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo el número de concesión R01CA135417 otorgado por el Instituto Nacional del Cáncer. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

10 Antecedentes de la invención

El cáncer sigue siendo una de las principales prioridades de salud pública. Por ejemplo, se estima que se produjeron 7,6 millones de muertes por cáncer en 2008. Los tratamientos para el cáncer mejoran constantemente a medida que avanza la tecnología y la ciencia. Desafortunadamente, se ha hecho evidente que muchas terapias contra el cáncer son eficaces solo en subconjuntos de pacientes con cáncer, incluso en subconjuntos de pacientes que tienen el mismo tipo de cáncer. Como resultado, es cada vez más importante encontrar formas de identificar a los pacientes que probablemente respondan al tratamiento.

Resumen de la invención

20 En un aspecto, la invención proporciona un método para evaluar la respuesta de un sujeto al tratamiento con un péptido Psap, comprendiendo el método: determinar un nivel de CD36 en una muestra obtenida de un sujeto que tiene cáncer, en el que un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con un nivel de control indica que el sujeto responde o es probable que responda al tratamiento con un péptido Psap, en el que el péptido Psap consiste en la secuencia de aminoácidos DWLPK (SEQ ID NO: 2) o una variante de sustitución de aminoácidos de la misma, en el que la sustitución de aminoácidos es:

a) Tirosina (Y) por Triptófano (W);

25 b) una sustitución de aminoácidos por Leucina (L) seleccionada entre Valina (V) o Alanina (A), o un aminoácido no canónico de tamaño similar, o un derivado de los mismos;

c) Arginina (R) por Lisina (K);

d) un isómero D de ácido aspártico (D) por un isómero L de ácido aspártico (D) y/o un isómero D de leucina (L) por un isómero L de leucina (L);

30 e) un isómero D de triptófano (W) por un isómero L de triptófano (W) y/o un isómero D de prolina (P) por un isómero L de prolina (P); o combinaciones de los mismos.

En una realización, el nivel de CD36 en la muestra se determina realizando un ensayo. En una realización, el método comprende además:

35 identificar al sujeto con un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con el nivel de control como sensible o con probabilidad de ser sensible al tratamiento con un péptido Psap. En una realización, el nivel de control es un nivel de CD36 de una célula o tejido no canceroso obtenido del sujeto que tiene el cáncer; en el que el nivel de control es un nivel de CD36 en una célula o tejido obtenido de un sujeto sano o una población de sujetos sanos; o en el que el nivel de control es un nivel predeterminado.

En una realización, el nivel de CD36 es un nivel de proteína CD36.

40 En una realización, el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, astrocitoma o melanoma.

45 En un aspecto, la invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer caracterizado por un nivel elevado de CD36 en una muestra en comparación con un nivel de control, comprendiendo la composición un péptido Psap, en el que el péptido Psap consiste en la secuencia de aminoácidos DWLPK (SEQ ID NO: 2) o una variante de sustitución de aminoácidos de la misma, en el que la sustitución de aminoácidos es:

a) Tirosina (Y) por Triptófano (W);

b) una sustitución de aminoácidos por Leucina (L) seleccionada entre Valina (V) o Alanina (A), o un aminoácido no canónico de tamaño similar, o un derivado de los mismos;

c) Arginina (R) por Lisina (K);

d) un isómero D de Ácido Aspártico (D) por un isómero L de Ácido Aspártico (D) y/o un isómero D de Leucina (L) por un isómero L de Leucina (L);

5 e) un isómero D de Triptófano (W) por un isómero L de Triptófano (W) y/o un isómero D de Prolina (P) por un isómero L de Prolina (P); o combinaciones de los mismos.

En una realización, el nivel de control es un nivel de CD36 de una célula o tejido no canceroso obtenido del sujeto que tiene cáncer; en el que el nivel de control es un nivel de CD36 en una célula o tejido obtenido de un sujeto sano o una población de sujetos sanos; o en el que el nivel de control es un nivel predeterminado.

En una realización, el nivel de CD36 es un nivel de proteína CD36.

10 En una realización, el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, astrocitoma o melanoma.

En una realización, el péptido Psap es un péptido cíclico.

En una realización, el aminoácido no canónico de tamaño similar es metilvalina, metil-leucina o sarcosina.

En una realización, la muestra es una muestra de tumor.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un gráfico que muestra la proliferación de células LLC 48 horas después de cantidades adicionales diluidas en serie de péptido Tsp-1 o DWLPK recombinante (SEQ ID NO: 2).

La Figura 1B es una fotografía de una transferencia de Western que muestra que la proteína CD36 se expresa en células LLC.

20 La Figura 2 es una fotografía de una transferencia western que muestra que la proteína CD36 se expresa en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-231, MCF-7), cáncer de ovario (ID8), melanoma (B16), cáncer de próstata (PC3 y LNCaP) y cáncer de pulmón (LLC).

La Figura 3 es una fotografía de una transferencia Western que muestra que la proteína CD36 se expresa en células de cáncer de ovario primario derivadas de ascitis de pacientes.

25 La Figura 4 es una fotografía de una transferencia Western que muestra que la proteína CD36 se expresa en células de páncreas (AsPC1), ovario (DF-14 e ID-8), mama (MDA-MB231 y LM2), próstata (PC3, PC3-M-LN4, LN-CAP y LN-CAP-LN3), melanoma (B16-B16) y cáncer de pulmón (LLC). Los ejemplos de líneas de células que expresan alto y bajo CD36 se muestran en cajones.

30 La Figura 5 es un gráfico que muestra que el péptido dWIP (SEQ ID NO: 47) provocó la regresión del cáncer en un modelo de cáncer que expresa altos niveles de CD36.

La Figura 6 es un gráfico que muestra que las células de cáncer de ovario que expresan CD36 son sensibles a la destrucción de células mediada por Tsp-1.

35 La Figura 7 es un gráfico que muestra la masa del tumor primario de ratones inyectados con células de cáncer de páncreas AsPC que expresan altos niveles de CD36 y luego tratados con péptido dWIP o control (SEQ ID NO: 47). La masa tumoral primaria se inhibió mediante tratamiento con péptidos.

La Figura 8 es un gráfico que muestra que el tratamiento de ratones con tumores de melanoma B 16-B16 (que expresan niveles bajos de CD36) con péptido dWIP (SEQ ID NO: 47) inhibió el crecimiento tumoral pero no causó regresión del tumor.

Descripción detallada de la invención

40 Los péptidos Psap son péptidos terapéuticos que contienen secuencias de aminoácidos que se derivaron originalmente de fragmentos de saposina A, una proteína antiangiogénica conocida. Los péptidos Psap generalmente comprenden una secuencia central de CDWLPK (SEQ ID NO: 1), DWLPK (SEQ ID NO: 2) o DWLP (SEQ ID NO: 3) o una variante de sustitución de aminoácidos de los mismos y pueden tener una longitud de tan solo 4 aminoácidos (por ejemplo, un péptido que consta de DWLP (SEQ ID NO: 3) o una variante de sustitución de aminoácidos). Se ha demostrado previamente que dichos péptidos Psap son eficaces para tratar

45 múltiples tipos de cánceres (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO2009002931 y WO/2011/084685; la solicitud PCT, PCT/US2012/71424, publicada como la publicación PCT WO/2013/096868, y las solicitudes de Patente de Estados Unidos 12/640.788 y 13/516.511). Anteriormente se pensaba que la administración de un péptido Psap estimulaba la trombospondina (Tsp-1) in vivo, que a su vez actuaba sobre las células

endoteliales provocando un efecto antiangiogénico que daba como resultado la inhibición indirecta del cáncer y/o el crecimiento metastásico.

Como se describe en el presente documento, se ha descubierto que las células tumorales de varios tipos diferentes de cánceres que responden a péptidos Psap expresan CD36. CD36 es un miembro de la familia de receptores depuradores de clase B de proteínas de la superficie celular y tiene muchos ligandos que incluyen lipoproteínas oxidadas de baja densidad, fosfolípidos oxidados, ácidos grasos de cadena larga, colágeno y Tsp-1. Sin desear estar ligado a ninguna teoría o mecanismo, se cree que la administración del péptido Psap estimula Tsp-1, que luego actúa directamente sobre las células tumorales interactuando con CD36 sobre las células tumorales. La interacción entre Tsp-1 y CD36 en las células tumorales puede dar como resultado la inhibición de la proliferación de células tumorales y/o la inducción de la apoptosis de las células tumorales. Por tanto, los péptidos Psap parecen tratar el cáncer a través de dos mecanismos independientes diferentes, indirectamente a través de un efecto antiangiogénico y directamente por la interacción de Tsp-1 con CD36 en las células tumorales. Por tanto, la capacidad de respuesta de un sujeto con cáncer al tratamiento con un péptido Psap puede depender del nivel de CD36 expresado por el cáncer.

Por consiguiente, los aspectos de la divulgación se refieren a métodos para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento con un péptido Psap determinando un nivel de CD36 en una muestra, tal como una muestra de tumor. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento se refieren a la identificación o selección de un sujeto para el tratamiento con un péptido Psap basado en un nivel de CD36 en una muestra, tal como una muestra de tumor. Otros aspectos de la divulgación se refieren a composiciones y métodos para el tratamiento de un sujeto con cáncer caracterizado por un nivel elevado de CD36 (por ejemplo, seleccionado o identificado sobre la base de que el cáncer tiene un nivel elevado de CD36 en una muestra en comparación con un nivel de control).

Como se usa en este documento, "sensible al tratamiento con un péptido Psap" incluye, pero no se limita a, prevención o reducción del desarrollo de un cáncer, reducción de los síntomas del cáncer, supresión o inhibición del crecimiento de un cáncer, prevención de metástasis y/o invasión de un cáncer existente, promoción o inducción de la regresión del cáncer, inhibición o supresión de la proliferación de células cancerosas, reducción de la angiogénesis y/o aumento de la cantidad de células cancerosas apoptóticas en respuesta a tratamiento con un péptido Psap.

Como se usa en este documento, "no responde al tratamiento con un péptido Psap" incluye, pero no se limita a, una ausencia de prevención o reducción del desarrollo de un cáncer, una ausencia de reducción de los síntomas del cáncer, una ausencia de supresión o inhibición del crecimiento de un cáncer, ausencia de prevención de metástasis y/o invasión de un cáncer existente, una ausencia de promoción o inducción de la regresión del cáncer, una ausencia de inhibición o supresión de la proliferación de células cancerosas, una ausencia de reducción de la angiogénesis y/o una disminución en la cantidad de células cancerosas apoptóticas en respuesta al tratamiento con un péptido Psap.

Métodos diagnósticos y teranósticos

Los aspectos de la divulgación se refieren a métodos de diagnóstico y teranósticos útiles para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento con un péptido Psap. En algunas realizaciones, el método comprende determinar un nivel de CD36 en una muestra obtenida de un sujeto que tiene cáncer, en el que un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con un nivel de control indica que el sujeto responde o es probable que responda al tratamiento con un péptido Psap (es decir, si el nivel de CD36 en la muestra es elevado en comparación con un nivel de control, el sujeto se identifica como sensible o susceptible de responder al tratamiento con un péptido Psap). En algunas realizaciones, el método comprende además identificar al sujeto con un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con el nivel de control como sensible o probable que responda al tratamiento con un péptido Psap. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto identificado como sensible o probable que responda al tratamiento con un péptido Psap con una cantidad eficaz de un péptido Psap descrito en el presente documento para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, la muestra obtenida de un sujeto que tiene cáncer es una muestra de tumor.

En algunas realizaciones, un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con un nivel de control indica que el cáncer retrocederá o es probable que retroceda en respuesta al tratamiento con un péptido Psap. En algunas realizaciones, el método comprende además identificar al sujeto con un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con el nivel de control que tiene un cáncer que retrocederá o es probable que retroceda en respuesta al tratamiento con un péptido Psap. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto identificado por tener un cáncer que retrocederá o es probable que retroceda en respuesta al tratamiento con un péptido Psap, una cantidad eficaz de un péptido Psap descrito en el presente documento para provocar la regresión del cáncer.

Como se usa en este documento, "un nivel elevado de CD36" significa que el nivel de CD36 está por encima de un nivel de control, tal como un umbral predeterminado o un nivel de CD36 en una muestra de control. Los niveles de control se describen en detalle en este documento. Un nivel elevado de CD36 incluye un nivel de

CD36 que está, por ejemplo, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más por encima de un nivel de control. Un nivel elevado de CD36 también incluye aumentar un fenómeno desde un estado cero (por ejemplo, expresión de CD36 inexistente o indetectable en un control) a un estado distinto de cero (por ejemplo, alguna expresión de CD36 o expresión de CD36 detectable en una muestra).

Como se usa en este documento, "tratamiento con un péptido Psap" pretende comprender la administración de un péptido Psap a un sujeto. Los péptidos Psap se describen en el presente documento. Debe entenderse que el tratamiento con un péptido Psap puede incluir el tratamiento con solo un péptido Psap o puede incluir el tratamiento con múltiples agentes o terapias, tal como un péptido Psap y otro agente quimioterapéutico y/u otra forma de terapia tal como cirugía, radioterapia o quimioterapia.

Tratamiento

Otros aspectos de la divulgación se refieren a composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un péptido Psap descrito en este documento para uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer caracterizado por un nivel elevado de CD36 en una muestra obtenida del sujeto en comparación con un nivel de control. En algunas realizaciones, se proporciona una cantidad eficaz de un péptido Psap para uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer, en el que el sujeto tiene un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con el nivel de control.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a composiciones y usos de composiciones en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto con cáncer caracterizado por un nivel elevado de CD36 en una muestra. En algunas realizaciones, la composición comprende un péptido Psap como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor.

Como se usa en este documento, "tratar" o "tratamiento" incluye, pero no se limita a, prevenir o reducir el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas del cáncer, suprimir o inhibir el crecimiento de un cáncer, prevenir la metástasis y/o invasión de un cáncer existente, promoviendo o induciendo la regresión del cáncer, inhibiendo o suprimiendo la proliferación de células cancerosas, reduciendo la angiogénesis y/o aumentando la cantidad de células cancerosas apoptóticas. En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer es una inhibición o supresión directa de la proliferación de células cancerosas y no implica una inhibición o supresión de la angiogénesis (que indirectamente conduce a la inhibición o supresión de la proliferación de células cancerosas).

Una cantidad eficaz es una dosis del péptido Psap suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable, tal como el tratamiento del cáncer. La cantidad eficaz variará con el cáncer particular que se esté tratando, la edad y la condición física del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier terapia concurrente, la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del médico. Para la administración a un sujeto tal como un ser humano, se puede emplear típicamente una dosis de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1 o 1 mg/kg hasta 50, 100, 150 o 500 mg/kg o más.

Los péptidos Psap y sus composiciones se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluida la administración sistémica, tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, última edición. Cuando se administra, se puede aplicar un péptido Psap en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener de forma rutinaria sal, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la divulgación. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Además, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Un péptido Psap se puede combinar, opcionalmente, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa una o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para la administración a un ser humano. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden mezclarse con las moléculas de la presente divulgación, y entre sí, de manera que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina

y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de carga, tales como polipéptidos y aminoácidos (23) componente de suero, tal como albúmina de suero, HDL y LDL; (22) alcoholes C2-C12, tales como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en la formulación agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. El término "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición farmacéutica de la presente divulgación se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitaria para el sujeto, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, portador o vehículo.

Están disponibles una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá del tipo de cáncer que se esté tratando y la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la divulgación, en términos generales, se pueden practicar usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen las vías oral, rectal, tópica, nasal, interdérmica o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutánea, intravenosa, intramuscular o infusión.

En algunas realizaciones, la administración es parenteral. Las preparaciones inyectables adecuadas para administración parenteral incluyen, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles y se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, tal como una solución en 1,3 propanodiol o 1,3 butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Para la administración tópica, la composición farmacéutica se puede formular en pomadas, ungüentos, geles o cremas, como se conoce generalmente en la técnica. La administración tópica puede utilizar sistemas de administración transdérmica bien conocidos en la técnica. Un ejemplo es un parche dérmico. Alternativamente, se puede utilizar el método de administración biolístico de pistola de genes. La pistola de genes es un dispositivo para inyectar información genética a las células, originalmente diseñado para la transformación de plantas. La carga útil es una partícula elemental de un metal pesado recubierta con ADN plasmídico. Esta técnica a menudo se denomina simplemente biolística. Otro instrumento que utiliza tecnología biolística es el sistema de suministro de partículas de PDS-1000/He. La composición descrita en el presente documento se puede recubrir sobre partículas de oro diminutas, y estas partículas recubiertas se "inyectan" en tejidos biológicos tales como hemangiomas y melanoma a alta presión. Loehr B. I. et al., J. Virol., 2000, 74: 6077-86, describe un ejemplo de método basado en pistola de genes para la vacunación de ganado con base en ADN.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también se administran adecuadamente por vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos locales así como sistémicos. Se espera que la vía intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores de ovario. Para estos usos, se pueden requerir preferentemente preparaciones farmacéuticas convencionales adicionales tales como tabletas, gránulos, polvos, cápsulas y aerosoles. En tales formulaciones también se pueden requerir aditivos convencionales adicionales tales como agentes aglutinantes, agentes humectantes, propelentes, lubricantes y estabilizadores.

Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, tabletas, pastillas, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del agente antiinflamatorio. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas del agente antiinflamatorio, aumentando la comodidad para el sujeto y el médico. Muchos tipos de sistemas de administración están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas de base polimérica tales como poli(lactida-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; tabletas comprimidas que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el agente antiinflamatorio está contenido en una forma dentro de una matriz tal como los descritos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo penetra a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones crónicas. Liberación a largo plazo, como se usa en este documento, significa que el implante está construido y dispuesto para administrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrones). Alternativamente, se pueden usar conservantes para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Se conocen bien varios conservantes e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Los ingredientes activos y/o las composiciones farmacéuticas normalmente se almacenarán en forma liofilizada o como una solución acuosa si es muy estable a la desnaturalización térmica y oxidativa. El pH de las preparaciones será típicamente de aproximadamente 6 a 8, aunque también pueden ser apropiados valores de pH más altos o más bajos en ciertos casos.

En algunas realizaciones, la administración de un péptido Psap puede combinarse con otra terapia, tal como quimioterapia, radiación y/o cirugía.

CD36

CD36 (Grupo de diferenciación 36) es una proteína de membrana integral que se encuentra en la superficie de muchos tipos de células en animales vertebrados y también se conoce como FAT, GP4, GP3B, GPIV, CHDS7, PASIV, SCARB3 y BDPLT10. La identificación del Entrez Gene para CD36 humano es 948. A continuación se muestran los ejemplos de transcritos y proteínas de CD36 humano:

Variante 1 del transcrito de CD36

TTTCTCAATTCTCTCIGGCCACAAAACCACACACTGGGATCTGCACACTGTAGAGTGCCTTTCTCTCTCTTTT
TTTGGGGGGGGGGAGGGGGGTGTGGTTGCATATTTAAACTCTCAGCGCATTATGTACTGAGGACTGCAGTG
TAGGACTTTCTCTGCAGAAATACCATTTGATCCTATTAAAGATGTGCCAAATGTGGAGCATTGTGATTGAA
AAATCCTTCTTAGCCATTTTAAAGATAGCTTTCCAAATGATTAGCAAAATGATTCTTTCTGTGACTCAT
CAGTTTCATTTCTCTGTAAAATTCATGTCTTGTCTGTTGATTTGTGAATAAGAAACAGAGCCTTGTAGAAACC
ACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGAAGAAGAACAGGTGCTTAACTACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAA
ATGGGCCTGTGACCGGAACGTGTGGGCTCATCGCTGGGGCTGTCTATGGTGTGTCTCTGGGCTGTCTTTGGA
GGTATTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTTAAAGCAAGTTGTCTCTCGAAGAA
GGTACAATTGCTTTTAAAAATTTGGGTTTAAACAGGCACAGAAGTTTACAGACAGTTTGGATCTTTGAT
GTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTTCAAGTTTAAAGCAAGAGGTCCTTATACG
TACAGAGTTTCGTTTTCTAGCCAAAGGAAAATGTAACCCAGGACCGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCTCT
CAGCCCCAATGGTGCCATCTTCCAACCTTCACTATCAGTTTGGAAACAGAGGCTGACAACCTTCACAGTTCT
AATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCCATATCTCAATAAAATCAATTTGTTCAAATGATCCTCAATTCACAT
ATTACAAGTCACAAATCTTCTATGTTTCCAAGTCAGAACTTTAGAGAACTGTTATGGGCTATAGGGAT
CCATTTTGTAGTTTGGTTCCGTACCTTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTATCTCTACAACAATACT
GCAGATGGAGTTTATAAAGTTTTCATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATAI
AAAGGTAAGGAATCTGTCTATTGGGAAAGTCACTGCGACATGATTAAATGGTACAGATGCAGCCCTCA
TTTCCACCTTTTGGTTGAGAAAAGCCAGGTATGTCAGTTCTTTTTCTTCTGATATTTGCAGGTCATCTAT
GCTGTATTTGAATCCGAGCTTAATCTGAAGGAATCCCTGTGTATAGATTTTGTCTTCCATCCAAAGGCC
TTTGCCCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACATTTGTTTCTGCACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATTGT
ACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAAATGCAAGAAGGGAGACCTGTGTACATTTCACTTCTCTCAT
TTTCTGTATGCAAGTCCTGATGTTTCAGAACCTATTGATGGATTAAACCCAAATGAAGAAGACATAGG
ACATACTTGGATATTGAACCTATAACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAAACCGGCTGCAGGTCAACCTA
TTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAAGTATTAAGAATCTGAAGAGGAACATATTGTGCCTATTCTT

TGGCTTAATGAGCTGGGACCAATTGGTGATGAGAAGGCCAAACATGTTTCAGAAGTCAAGTAACGGAAAA
ATAAACCTCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTAGTGTGGTGTGATGTTTGTGTTGTTGTTTATG
ATTTCTATTTGTGATCGAGATCGAAAACAATAAAATAAACCTGGGCTCAGCAACCAAAACCAATTTGTGT
GTTCTGATTCAATAAATTGTTTCTGGGTGGCCAATTGAGAAGAAGAGTGTACATGCTCAACAAATCCTA
GGCCCTGCATTCTGTCTATCCTCATCCGGGGGAAACACCATCATCCAGTAGCTGCCCTATTCAACTGC
AACAGTCTCCAGGACCATCAGTATACCTGCATTTATGTCACCAAAATATTTTGAAGACATTTATAAAT
AATTTGGCTTATGACTCATATTTCTCTATGAATACCTTCATACAGCAGGTATAACTCTTTCTTTATGG
CTTAAATATTTGTGACTGATCCTGCAAAATGGACATCATTTTACGACACTAGCGGTTTATATTTTAAAG
ACCTTCATTTCTGTTTCTGCACTCTTCTGGAATTTAGTAAATTTTGTCTTTTTTTTTTTTACTCAGT
GCAACTTACGCTTGGCATCTTCAGAATGCTTTTCTAGCATTAAGAGATGTAATGATAAAGGAATTTAT
GTATGAAATATTACAAAGCGTAGACTATGCATTTGTTATTCATTATAATATTTTGTGCTGTATATCGC
CTCATAAAGACAGGTTTCAACCATTAATAATGTTCTTCTTAAATTTCCCTGCTTTTCTAGTTCTCT
TTGTGTCATAAAATGTTTATCCTAAATTTTCTCTCGAAGTATATTTATCTGAATCCACATTTCTTTAT
AAATCCATAGTCCTTGTCTGAAATATGCTTTCTAAATTTTCTACCCTTTGTTCTAGGCTAAATTTTTTAA
CTAATTGGATGAAGAACAAGAACATTTGGTTTCTATCTTTTACAGCAGTAGGACAATGCAAGGTTT
TTCCTTTTTCATAAGGAGACACATTAATAGTTAACTCTGTTTCTTGAGCAGGGGTTCACTTATTTCTG
AGCATTAGTTTCTCTTCAAAAAGCTCCAGCATAGAAAAGGCAAGATAAACCAAAATCTAGCTTGTGTTTAC
CCACAGAAGGATACAGGACAAGGAATAGTAAGTGGCTGTTTGGATATTAATAATCGAAAAATAACTTTT
AGCCTCTCTCTTATGATAGCCGCCAGAGTAAATGTTGAGCATTTACTACAGAAAAGCCACAAACCAAGAA
TCTACCTGTTTGGAAAGATCTTTGTCATCTCTGAAGGTGCTTAAAGCATACTTAGTGCCTTTCTTTTA
ACTGGGAGATATAAGAAATATCTGTCCAGATATTAATATGTAAAGATACATTGTAGACATGTTCTTC
TGATAATACAAAGGTTATCTATTTGTCATTAGGATATTTGTGTCAGATCTCCATTAATAAAGGAAAG
TTTTTTTAACTATTGAGGCATGTAGGGCTGAGTTATATAATGTGAAGAACTTCAAAGATAATGGATGAG
AATATACATATTGACCTGTATATTTAGCTAATCATGACTCAGATCTTAATACAGGGATGATCTCATAG
CATTTAGATATCAGAAAAGGTTTGCACCTATATGCTTTAATATTTGTTTGAATACATGTATAATCTTTA
TCATTCTCAGTGTTTCATTTCTCAAATCTGTAAAGGAATATAAGAGGAAAGACAAATTCATATACAA
AGACAACGAGATTAAAAATATGCAGTAGGAAAAATAATTAAGGGAGACATTTTTTTTACATAGAAAT
CTGGGCTTTGGATGT
GGCAACTTTGGGGAATATGTTACATGTGTGATTTGTTTGGCTTGGCGAAGTAAATGTTTGTTCAGAAAG
GGTAAATGTTTGGACACTTGCAATGCTCATGGATGAATTTATATGTTTGTAGTCATAGAAAAATGTGAC
CCTTTGTATAGAAGCACATTTCTTCCAAGCTGGTTATTAACCCACAGAAATATAGAGGATTTCAATAA
CTTAAGTTTGAATAATCAATGACGCTGTGCAATGGATTAAACAGATTAGAGAAATCAACAGCATCTGGAAAA
AGGTTAATGTCATATGCTTCTTAAACAGTCATGAAGAAATAGAAGCATGATGAGCTTTCAAGTTCTGCA
CAGAAAAGGGTGAAGGAGGGTATCATTTTCAAGAAAAAATAAGTCTACCCGAATGGTTATCTCTGAAA
ATATTTGTATTAAAGATGTGTATACATGGCCAGGCATGTGTGGCTCATGCCGTGAATCCACAGCACTTTGG
AGGCAGGTGGATCAGAGGTCAGGAGATCAAGACCATCTGGCCAAACATGTGTAAACCTCATCTCTACT
AAAAATACAAAAATCAGCAGGGGTGTGGTGGCCCATGCGCTGTAGTCCCAGCTGTCTCGGGAGACTGAACT
CTTAGGCTCTGGGAAGCAGAGGTTGCACTGAATGAGATCGCTGCTAGCTGCATCCAGCTGGTGGACAGAG
CGAGATTCCTATCTCAAAAAAAGAAACAGATGCACAGTACAAATTTCTTAACTGTTATCAATGTCTGGA
GCTACATAAATATCTTTCTAGTTGGAGTTTGTGTTTAGGTGTGTACCAACTGACATTTTCAAGTTTCTGT
TTGAAGTCCAATGATTTAGTACTCTGTGGCTGCTCTTCACTGCCCCCTGTGGGCTGTCTACAATTT
CTAAATGGATTTGAACCTCAATGTCTGCTGCTTCTGTTTCTCTGCATATACCAATAGCATTTACCTATGAC
TTTTTTTTTCTGAGCTATTTTCACTGAGCTGAGCTAATGAACATAAACTCAGTTATGTTTAAATATTG
TATCAAAATACATAAAGGAATTACTGTTTTTCTTTTGTGGTCAAAAGGTAGCTGCATTTTAAAAATTT
TGTGAAAAATAAAAACTTTTGTATTAGAAAAATGA (SEQ ID NO: 4)

Variante 2 del transcritpo de CD36

GAGGATGTCAATGGCTTTCAGATGTCAGGATAACCTTAAGGATAGATGAAGGGTTGAGAGCCTGTGCCT
 CATTTCAGTTCCTCAGCTGCTATGCCGTGGAAATCCTGTTTACTTTCTGCATCTGCTCCTGCAAGACT
 CTGGAGCCAGTCTTGAGGTCCCTACATCTCCGAAAGCAAGCTCTTCTAGAAAGTTGATAGCTTTCCAAIGA
 TTAGACGAATTTGATCTTTCTGTGACTCATCAGTTCAATTCCTGTAAAATTCATGTCTTGTCTGTTGATT
 TGTGAATAAGAACCAGAGCTTGTAGAAACCACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGCAAGAAACAGGTGCT
 TAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAAATGGGCTGTGACCGGAACCTGIGGGCTCATCGCTGGGGCT
 GTCATTGGTGCTGTCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCTAATGCCAGTTTGAGAGCCTGCTTATCCAGAAG
 ACAATTAAGCAAGTTGTCTCGAAGAAGGTACAATTCGCTTTTAAAAATTGGGTTAAACAGGCACAC
 GAAGTTTACAGACAGTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAAC
 ATTCAGTTTAAGCAAGAGGTCTTATACGTACAGAGTTCGTTTCTAGCCAAGGAAAAATGTAACCCAG
 GACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACTATCAGTT
 GGAACAGAGGCTGACAACTTCAGAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAAT
 CAATTTGTTCAAATGATCCTCAATTCATTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAAGTCAGAACT
 TTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTGTAGTTTGGTTCCGTACCTGTACTACCACA
 TTGGTCTGTCTTTATCCTTACAAACAATACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTTTCAATGGAAAAAGATAAC
 ATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATATAAAGGTAAAAGGAATCTGTCTATTTGGGAAAGTCACTGC
 GACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCTCATTTCACCTTTTGTGAGAAAAGCCAGGTATTGCAGTTC
 TTTTCTCTGATATTGTCAGGTCAATCTATGCTGTGATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCT
 TGTGATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTTC
 TGCACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATTGTACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAAATGCAAGAA
 GGGAGACCTGTGTACATTTCACCTCTCATTTTCTGTATGCAAGTCTGTATGTTTCAGAACCTATTGAT
 GGATTAACCCCAATGAAGAAGACATAGGACATCTGGATATTGAACCTATACTGGATTCACTTTA
 CAATTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAGATATTAAAGAAT
 CTGAAGAGGAACATATTGTGCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGGACCATTGGTGATGAGAAGGCA
 AACATGTTTCAGAAAGTCAAGTAACCTGGAAAAATAAACCTCCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTCAGT
 GTTGGTGTGGTGATGTTTGTGCTTTTATGATTTTCATATTGTGCATGCAGATCGAAAAACAATAAAAAATA
 GTAAGTATGTACCAAAAAATATTGCTTCAATAATATTAGCTTATATATTACTTGTCTTCACTTTATCAA
 AGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATATTCTAGACATGTCTAGCCACTGATCATTTTTAAATATAGG
 TAAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGATCACTAAAGTATATCTTTAATCTGGGAGAAATGAGATA
 AAAGATGTACTTTGTGACCATTTAACAATAGCACAAATAAAGCACTTGTGCCAAAGTTGTCCAAAAAA
 (SEQ ID NO: 5)

Variante 3 del transcritpo de CD36

CTTTCAATTCCTCTGGCAACAAACCACACACTGGGATCTGACACTGTAGACTGCTTTCTCTTCTTTT
 TTTGGGGGGGGAGGGGGTGTGTTGTCATATTTAACTCTCACGCATTTAIGTACTGAGGACTGCA3TG
 TAGGACTTTCTGAGAAATACCATTTGATCCTATTAGAATTGTCCAAATGTTGGAGCATTTGATTGAA
 AAATCCTTCTTAGCCATTTTAAAGATAGCTTTCCAATGATTAGACGAATTCATTCTTTCTGTGACTCAT
 CAGTTTCATTTCCTGTAAATTCATGCTCTTGTGTTGATTGTTGAATAAGAACCCAGAGCTTGAGAAACC
 ACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGCAAGAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAA
 ATGGGCTGTGACCGGAACGTGTGGGCTCATCGCTGGGGCTGTGATTTGGTGTGCTCTGGCTGTGTTTGA
 GGTATTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTAAGCAAGTTGTCTCTGGAAGAA
 GGTACAATTGCTTTTAAAAATTGGGTTAAACAGGCACAGAAAGTTTACAGACAGTTTGGATCTTTGAT
 GTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAGAGGCTCCTTATACG
 TACAGAGTTGCTTTTCTAGCCAAGGAAAAATGAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCTG
 CAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACTTCACAGTTCTC
 AATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTTGTTCAAAATGATCCTCAATTCACCT
 ATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAGAAGTCTTATGGGGCTATAGGGAT
 CCATTTTTGAGTTTGGTTCCGTACCCIGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTATCCCTTACAACAATACT
 GCAGATGGAGTTTATAAAGTTTCAATGGAAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATAT
 AAAGGTAAGGAATCTGTCTATTGGGAAAGTCACTCCGACATGATTAAAGGTACAGATGCAGCCTCA
 TTTCCACCTTTTGTGAGAAAAGCCAGGTATTGCAGTCTTTTCTTCTGATATTGTCAGGTCAATCTAT
 GCTGATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTGTTCTTCCATCCAAGGCC
 TTGCTCTCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTCTGACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATTTG
 ACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAAATGCAAGAAAGGGAGACCTGTGTACATTTCACTTCTCAT
 TTTCTGTATGCAAGTCTCTATGTTTTCAGAACCTATTGATGGATTAAACCCCAATGAAGAAGACATAGG
 ACATACCTGGATATTGAACCTATACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAAACGGCTCGAGGTCAACCTA
 TTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAGTATTAAAGAATCTGAAGAGGAACCTATATTGTGCTTATTCTT
 TGGCTTAATGAGACTGGGACCATTGGTGTGAGAAAGGCAAAACATGTTTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGAAA
 ATAAACCTCCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTGTTGGTGTGGTGATGTTTGTGCTTTTATG
 ATTTTCATATTGTGCATGCAGATCGAAAAACAATAAAATAAGTAAGTATGTACCAAAAAATATTGCTTCAA
 TAATATTAGCTTATATATTACTTGTTTTCACTTTTATCAAGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATATT
 TCTAGACATGTCTAGCCACTGATCATTTTTAAATATAGGTAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGA
 TCACTAAAGTATAICTTTAATCTGGGAGAAATGAGATAAAAGATGTACTTGTGACCATTTGTAACAATA
 GCACAAATAAAGCACTTGTGCCAAAGTTGTCCAAAAAA (SEQ ID NO: 6)

Variante 4 del transcritpo de CD36

AAGTTGCTGAGACAAGGAAGAGAGATGAGGAACACAGAGCTTGTAGAAACCACTTTAATCATATCCAGG
AGTTTGCAAGAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAAATGGGGTGTGACCGGAAC
TGTGGGCTCATCGCTGGGGCTCTCATTGGTGCTGTCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCTAATGCCAGTT
GGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTAAGCAAGTGTCTCGAAGAAGGTACAATTCGCTTTTAA
AATTGGGTAAACAGGCACAGAAAGTTTACAGACAGTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAA
GTGATGATGAACACAGCAACATTCAAGTTAAGCAAGAGGTCTTATACCTACAGAGITCGTTTTCTA
GCCAAGGAAATGTAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCTCAGCCCAATGGTGCCATC
TTGCAACCTTCACIATCAGTTTGAACAGAGGCTGACAACTTCACAGTTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGCT
GCATCCCATACTATCAAAATCAATTTGTTCAAAATGATCCTCAATTCACITATTAACAAGTCAAAATCT
TCTATGTTCCAAAGCAGAACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGAICCATTTTIGAGTTGGTT
CCGTACCTCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTATCCTTACAACAATACGAGATGGAGTTTATAAA
GTTTTCAATGAAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATAAAGGTAAAAGGAATCTG
TCCTATTGGGAACTCAGTCGCACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCTCATTTCCACCTTTTGTGAG
AAAAGCCAGGTATTGCAGTTCTTTCTTCTGATATTTCAGGTCATCTATGCTGTATTTGAATCCGAC
GTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCCTCTCCAGTTGAA
AACCCAGACAACCTATTGTTTTCGACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATTGACATCATATGGTGCTA
GACATCAGCAAAATGCAAGAGGAGACCTGTGTACATTTCACTTCCTCATTTTCTGTATGCAAGTCTCT
GATGTTTTCAGAACCTATTGATGGATTAACCCCAATGAAGAAGACATAGCACATACTTGGATATTGAA
CCTATAACTGATTCACCTTACATTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAA
AAAAATTCAGGTATTAAGAAATCTGAAGAGGAACATATTGTGCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGG
ACCATTGGTGATGAGAAGGCAACATGTTGAGAAGTCAAGTAACTGGAAAAATAAACCTCTTGGCCTG
ATAGAAATGATCTTACTCAGTCTTGGTGTGGTGATGTTGTTGCTTTTATGATTTTATATTGTCATGC
AGATCGAAAAACAATAAATAAGTAAAGTATGTACCAAAAAATATTGCTTCAATAATATTAGCTTATATAT
TACTTGTTTTACITTTATCAAGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATATTTCTAGACATGTCTAGCCA
CTGATCATTTTTAAATATAGGTAAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGATCACTAAAGTATATCTTT
AATTCTGGGAGAAATGAGATAAAAGATGTACTTGTGACCATTGTAACAATAGCACAAATAAGCACTTG
TGCCAAAGTTGTCCAAAAA (SEQ ID NO: 7)

Variante 5 del transcripto CD36

ATGACATTATTAGTTCTGCCACTGGTAGGCATTAGAAGCAAGAAAAGGGAGACGGACCGAGGAAGCCAC
TTTGGTGAACAAAAAGAAAGCATTGTTTATTTAGAACGGCAAAATGATACGTTTCAGTGGGTGTT
TTCTTTGTACTTTGATCTTTTGTACTGATATTTAAGCTTCTGTTTTATGATCTCTTTCTAAATGATAGA
ACAGAGCTTGTAGAAACCACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGAAGAAACAGGTGCTTAAACATAATT
CACCTCCTGAACAAGAAAAATGGGCTGTGACCGGAACCTGTGGGCTCATCGCTGGGGCTGTCTTGGTGC
TGCTCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTA
GCAAGTTGCTCGAAGAAGGTACAATTCCTTTTAAAAATTGGTTAAAAACAGGCACAGAAGTTACAG
ACAGTTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAGTTAA
GCAAGAGGTCTTATACGTACAGAGTTCTGTTTTCTAGCCAAGGAAATGTAACCCAGGACGCTGAGGA
CAACACAGTCTCTTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACATATCAGTTGGAACAGAGGC
TGACAACCTTCACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTTGTTCA
AATGATCCTCAATTCACCTTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAGA
GTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTGGCTTGGTTCCGTACCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTT
TTATCCTTACAACAATACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTTTTCAATGGAAAAAGATAACATAAGTAAAGT
TGCCATAATCGACACATATAAAGGTAAAAGGAATCTGTCCTATTGGGAAAGTCACTGCGACATGATTAA
TGGTACAGATGCAGCCTCATTTCCACCTTTTGTGAGAAAAGCCAGGTATTGCAGTTCTTTTCTCTGA
TATTTGCAGGTCAATCTATGCTGTATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATT
TGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCCTCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTTCTGCACAGAAA
AATTATCTCAAAAAATTGTACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAAATGCAAGAAAGGGAGACCTGT
GTACATTTCACTTCCICATTTTCTGTATGCAAGTCTCTGATGTTTCAGAACCTATTGATGGATTAAACCC

AAATGAAGAAGAACATAGGACATACTTGGATATTGAACCTATAACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAA
ACGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAGTATTAAAGAACTGAAAGAGGAA
CTATATTGTGCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGGACCATTTGGTGTGAGAAGGCAACATGTTTCA
AAGTCAAGTAACTGGAATAAACCCTCCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTGGTGTGGT
GATGTTTGTGCTTTTATGATTTTATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CCAAAAAATATTGCTTCAATAATATTAGCTTATATATTACTTGTTTTCACTTTATCAAGAGAAAGTTAC
ATATTAGGCCATATATATTCTAGACATGCTAGCCACTGATCATTTTAAATATAGGTAATAAACCT
ATAAATATTATCACGCAGATCACTAAAGTATATCTTAAATCTGGGAGAAATGAGATAAAGATGTACT
TGTGACCATTGTAACAATAGCACAAATAAAGCACTTGTGCCAAAGTTGTCCAAAAA (SEQ ID NO:
8)

MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVL EEGTIAFKNWVKTGIEVYRQFWIFD
VQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTD AEDNTVSFLQPNGAIFEP SLSVGTEADNFTVL
NLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQVRTLRELLWGYRDPFLSLVPYPVTTIVGLFYPYNN
ADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWESHCDMINTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIY
AVFESDVNLKGIPVYRFLPSKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNC TSYGVLDISKCKEGRPVYLSLPH
FLYASPDVSEPIDGLNPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNL LKVPSEKIQVLKLNKRN YIVPIL
WLNETGTIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILL SVGVVMFVAFMISYCACRSKTIK (SEQ ID NO:
9)

Péptido Psap

La prosaposina (Psap) es la proteína precursora de la saposina compuesta por aproximadamente 524-527 aminoácidos que incluye un péptido señal de 16 aminoácidos. El polipéptido precursor de longitud completa se somete a glicosilación y modificación cotraduccional en el retículo endoplasmático y el sistema de Golgi para producir una proteína precursora de 70-72 kDa. Después del transporte al lisosoma, la catepsina D participa en su procesamiento proteolítico para producir formas moleculares intermedias de 35 a 53 kDa y luego a una glicoproteína de 13 kDa y finalmente a las formas maduras parcialmente glicosiladas de 8-11 kDa de moléculas de saposina individuales (O' Brien J.S. y Kishimoto Y, The FASEB J., 5: 301-8, 1991; Kishimoto Y. et al., J. Lipid Res. 33: 1255-67, 1992). La prosaposina se procesa en 4 productos de escisión: Saposinas A, B, C y D. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas A, B y C de la preproteína Psap y la secuencia de aminoácidos del producto de escisión saposina A se encuentran a continuación:

Isoforma A de la preproteína Psap

MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNK
PTVKS LPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSY
LPVILDIIKGEMSRPGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFM
ANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEEC
DRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHHMQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKV
ASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKM
CSKLPKSLSEECQEVVD TYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALT VHVTQPKD
GGFCEVCKKL VGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCSFLPDYPYQKQCDQFVAEYEPVLI
EILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGT ECKIWGPSYWCQNTETAAQCNAVEHCKR
HVWN (SEQ ID NO: 10)

Isoforma B de la preproteína Psap

MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNK
PTVKS LPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSY
LPVILDIIKGEMSRPGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFM
ANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEEC
DRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHHMQDQPKKEICALVGFCDEVKEMPMQTLV
PAKVASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFD
KMCSKLPKSLSEECQEVVD TYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALT VHVTQ
PKDGGFCEVCKKL VGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCSFLPDYPYQKQCDQFVAEYE
PVLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGT ECKIWGPSYWCQNTETAAQCNAVEH
CKRHVWN (SEQ ID NO: 11)

Isoforma C de la preproteína Psap

MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNK
 PTVKSLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSY
 LPVILDIKGEVSRPGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFM
 ANIPLLLYPQDGPGRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEEC
 DRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHMDQQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPA
 KVASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDK
 MCSKLPKSLSEECQEVVDTYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCGTRLPALTVHVTQP
 KDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCFLPDYPYQKQCDQFVAEYEP
 VLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKIWGPSYWCQNTETAACQNAVEHC
 KRHVWN (SEQ ID NO: 12)

saposina A

SLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSYLPVI

L DIKGEVSRPGEVCSALNLCES (SEQ ID NO: 13)

- 5 Los aspectos de la divulgación se refieren a un péptido Psap y sus usos. Los péptidos Psap comprenden secuencias que se derivaron originalmente de fragmentos de saposina A. Se demostró previamente que los fragmentos de saposina A que constan de tan solo 4 aminoácidos, y variantes de estos fragmentos, tenían actividad antiangiogénica y anticancerígena. Los péptidos Psap y los métodos para fabricar péptidos Psap son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO2009002931 y WO/2011/084685; la solicitud PCT, PCT/US2012/71424, publicada como la publicación PCT WO/2013/096868, y las solicitudes de patente de los Estados Unidos 12/640.788 y 13/516.511).

Un péptido Psap para uso en aspectos de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos DWLPK (SEQ ID NO: 2) o una variante de sustitución de aminoácidos de las mismas, en la que la sustitución de aminoácidos es:

- a) Tirosina (Y) por triptófano (W);
- 15 b) una sustitución de aminoácido por leucina (L) seleccionada entre valina (V), o alanina (A) o un aminoácido no canónico de tamaño similar, o un derivado del mismo;
- c) Arginina (R) por lisina (K);
- d) un isómero D de ácido aspártico (D) por un isómero L de ácido aspártico (D) y/o un isómero D de leucina (L) por un isómero L de leucina (L);
- 20 e) un isómero D de triptófano (W) por un isómero L de triptófano (W) y/o un isómero D de prolina (P) por un isómero L de prolina (P); o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un péptido Psap consiste en la secuencia de aminoácidos DWLPK (SEQ ID NO: 2).

- 25 Los péptidos Psap se pueden sintetizar usando cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos de métodos de síntesis incluyen, pero no se limitan a, síntesis recombinante, síntesis en fase líquida, síntesis en fase sólida, ligación química (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., Eds., Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Schnolzer, M.A., P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, SBH (2007). "In Situ Neutralization in Boc-chemistry Solid Phase Peptide Synthesis". Int. J. Peptide Res. Therap. 13(1-2): 31-44; Albericio, F. (2000). Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide (1 ed.). Boca Raton: CRC Press; página 848; y Nilsson BL, Soellner MB, Raines RT (2005). "Chemical Synthesis of Proteins". Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 34: 91-118; y las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.749.742, 4.794.150, 5.552.471, 5.637.719, 6.001.966, 7.038.103, 7.094.943, 7.176.282 y 7.645.858).

- 35 En algunas realizaciones, el péptido Psap puede modificarse, por ejemplo, mediante oligomerización o polimerización (por ejemplo, dímeros, trímeros, multímeros, etc.), modificaciones de residuos de aminoácidos o estructura peptídica, entrecruzamiento, ciclación, conjugación, pegilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, fusión con secuencias de aminoácidos heterólogos adicionales (por ejemplo, un anticuerpo o dominio Fc de anticuerpo, transferrina sérica o porciones de la misma, albúmina o transtiretina), u otras modificaciones que alteren sustancialmente la estabilidad, solubilidad, u otras propiedades del péptido al tiempo que retiene o potencia sustancialmente la actividad terapéutica. La conjugación puede ser, por ejemplo, a un
- 40 polímero. Los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido divinil éter maleico, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, poliol polioxetilado, heparina,

fragmentos de heparina, polisacáridos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, polivinil etil éteres y α,β -poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida y similares, o mezclas de los mismos. La conjugación puede realizarse a través de un enlazador, por ejemplo, un péptido o un enlazador químico. Los métodos de modificación de péptidos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.180.816, 5.596.078, 5.990.273, 5.766.897, 5.856.456, 6.423.685, 6.884.780, 7.610.156, 7.256.258, 7.589.170 y 7.022.673, y la publicación PCT WO 2010/014616).

En algunas realizaciones, el péptido Psap es un péptido cíclico. Los péptidos cíclicos son cadenas polipeptídicas cuyos extremos amino y carboxilo están unidos por un enlace peptídico u otro enlace covalente, formando una cadena circular. En una realización, el péptido contiene residuos de aminoácidos de cisteína en el terminal amino y carboxilo. Las cisteínas facilitan la formación de enlaces disulfuro S-S. En una realización, el péptido contiene residuos de aminoácidos de cisteína adicionales, en los que los residuos de aminoácidos de cisteína están cerca de los extremos pero no necesariamente en el puro extremo. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos de cisteína están dentro de los cinco residuos de aminoácidos de los extremos del péptido. Los métodos de diseño y síntesis de péptidos cíclicos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.596.078; 5.990.273; 7.589.170 y la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20080287649.

En algunas realizaciones, el péptido Psap se modifica funcionalmente para mejorar la estabilidad. En algunas realizaciones, el péptido Psap comprende un grupo acetilo en el terminal N y/o un grupo amida en el terminal C. En algunas realizaciones, el péptido Psap comprende un grupo acetilo en el terminal N y un grupo amida en el terminal C. En algunas realizaciones, el péptido Psap es Ac-dWIP-Amida o Ac-DWLP-Amida (Ac = grupo acetilo, D minúscula y L indican D-aminoácidos, SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente). En algunas realizaciones, las modificaciones químicas del péptido Psap incluyen, pero no se limitan a la inclusión de, grupos alquilo, alcoxi, hidroxialquilo, alcóxialquilo, alcóxicarbonilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, amino, alquilamino, aminoalquilo, dialquilamino, aminodialquilo, halógeno, heteroátomo, carbociclo, carbociclilo, carbociclo, carbocíclico arilo, aralquilo, aralcoxi, ariloxialquilo, heterociclo, heterociclilo, heterocíclico, heteroarilo y/o alifático.

Los péptidos Psap también abarcan peptidomiméticos (por ejemplo, péptidos D, péptidos β y peptoides). Los peptidomiméticos utilizados pueden abarcar toda la longitud del péptido Psap, o solo una porción del péptido Psap. Los peptidomiméticos pueden incluir, por ejemplo, D-aminoácidos, enlaces amida reducidos para la estructura del péptido y enlaces no peptídicos para unir las cadenas laterales, pirrolinona y miméticos de azúcar. El diseño y la síntesis de miméticos de péptidos con estructura de azúcar están descritos por Hirschmann et al., (J. Med. Chem., 1996, 36, 2441-2448).

Además, también se describen peptidomiméticos basados en pirrolinona (véase, por ejemplo, Smith et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 11037-11038). En algunas realizaciones, el péptido Psap está en forma de un peptoide (patente de los Estados Unidos No. 5.811.387; Simon et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, (1992), 89(20), 9367-9371). En algunas realizaciones, los peptoides son glicinas poli-N sustituidas. En los peptoides, la cadena lateral está conectada al nitrógeno de la estructura del péptido, en lugar del carbono α como en los péptidos. En algunas realizaciones, el peptoide contiene unidades de monómero nitroaromático (Fowler et al., J Org Chem. 20 de febrero de 2009; 74(4): 1440-9). En algunas realizaciones, el peptoide sustituido en N con cadenas laterales aromáticas alfa-quirales (Gorske et al., J Am Chem Soc. 8 de noviembre de 2006; 128(44): 14378-87) en uno o más residuos. En algunas realizaciones, el péptido Psap comprende una región peptoide (es decir, que contiene una o más cadenas laterales conectadas al nitrógeno de la estructura del péptido) y una región peptídica (es decir, que contiene una o más cadenas laterales conectadas al carbono α).

Sustituciones de aminoácidos de Psap

En algunas realizaciones, un péptido Psap comprende una variante de sustitución de aminoácidos de DWLPK (SEQ ID NO: 2), en la que la sustitución de aminoácidos es:

a) Tirosina (Y) por triptófano (W);

b) una sustitución de aminoácido por leucina (L) seleccionada entre valina (V), o alanina (A), o un aminoácido no canónico de tamaño similar, o un derivado del mismo;

c) Arginina (R) por lisina (K);

d) un isómero D de ácido aspártico (D) por un isómero L de ácido aspártico (D) y/o un isómero D de leucina (L) por un isómero L de leucina (L);

e) un isómero D de triptófano (W) por un isómero L de triptófano (W) y/o un isómero D de prolina (P) por un isómero L de prolina (P); o combinaciones de los mismos.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga, tamaño, polaridad, hidrofobicidad similar o combinación de los mismos. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos normalmente no cambian la estructura general del péptido y/o el tipo de cadenas laterales de aminoácidos disponibles para formar enlaces de van der Waals con un compañero de unión. En algunas realizaciones, una sustitución conservadora de leucina es valina. En algunas realizaciones, una sustitución conservadora de leucina es valina o alanina.

En algunas realizaciones, se contemplan sustituciones conservadoras o no conservadoras de leucina. En algunas realizaciones, la sustitución de leucina es valina, glicina o alanina. En algunas realizaciones, una sustitución de leucina es glicina. En algunas realizaciones, una sustitución de leucina es glicina o valina. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una tirosina (Y) por un triptófano (W).

Los ejemplos de variantes de sustitución de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, DWAP (SEQ ID NO: 41), DYLPK (SEQ ID NO: 42), DWVPK (SEQ ID NO: 43), DWLPR (SEQ ID NO: 44), DWAPK (SEQ ID NO: 45) y DYLP (SEQ ID NO: 46).

También se contempla en este documento la sustitución con un aminoácido no canónico. En algunas realizaciones, la leucina se sustituye por un aminoácido no canónico. En algunas realizaciones, el aminoácido no canónico que sustituye a la leucina tiene un tamaño similar al de la leucina, la valina, la alanina o la glicina. Ejemplos de aminoácidos no canónicos incluyen azidoalanina, azidohomoalanina, azidonorvalina, azidonorleucina, azidonorvalina, homoaliglicina, homoproparglicina, norvalina, norleucina, cis-crotilglicina, trans-crotilglicina, ácido 2-aminoheptanoico, 2-butilglicina, alilglicina, 3-(1-naftil)alanina, 3-(2-naftil)alanina, p-etinil-fenilalanina, p-propargil-oxi-fenilalanina, m-etinil-fenilalanina, 3-(6-cloroindolil)alanina, 3-(6-bromoindolil)alanina, 3-(5-bromoindolil)alanina, azidohomoalanina, homopropargilglicina, p-clorofenilalanina, ácido α -aminocaprílico, metilvalina, metileucina o sarcosina. En algunas realizaciones, la leucina se sustituye con un aminoácido no canónico seleccionado entre metilvalina, metileucina o sarcosina. Los aminoácidos no canónicos y los métodos de síntesis de los mismos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de los Estados Unidos Nos. 2010-0247433, 2008-0214439, 2004-0053390 y 2004-0058415; publicación PCT WO 03/073238; y la patente de los Estados Unidos No. 6.586.207).

La sustitución de aminoácidos se puede lograr durante la síntesis química del péptido añadiendo el aminoácido sustituto deseado en la secuencia apropiada en el proceso de síntesis. Alternativamente, se pueden utilizar métodos de biología molecular. Las sustituciones no conservadoras también se incluyen en la medida en que retienen sustancialmente las actividades de los péptidos descritos en el presente documento.

Como se describió previamente, los péptidos Psap que comprenden CDWLPK (SEQ ID NO: 1), DWLPK (SEQ ID NO: 2) o DWLP (SEQ ID NO: 3) que tienen sustituciones de D-aminoácidos también mostraron tener una actividad terapéutica deseada (véase la solicitud PCT, PCT/US2012/71424, publicada como la publicación PCT WO/2013/096868). Como tales, las variantes de sustitución de aminoácidos resultantes de la sustitución de uno o más D-aminoácidos por el L-aminoácido similar se contemplan en el presente documento. En algunas realizaciones, está presente una sustitución de D-aminoácido. En algunas realizaciones, están presentes 2 o más sustituciones de D-aminoácidos. En algunas realizaciones, están presentes 3, 4 o 5 sustituciones de D-aminoácidos. En algunas realizaciones, las sustituciones de D-aminoácidos están espaciadas uniformemente, por ejemplo, cada aminoácido de por medio, de los 4-6 mer. En algunas realizaciones, la sustitución de D-aminoácido es por triptófano (W) y/o prolina (P). En algunas realizaciones, la sustitución de D-aminoácido es por ácido aspártico (D) y/o leucina (L). La convención L y D para la configuración de aminoácidos no se refiere a la actividad óptica del aminoácido en sí, sino más bien a la actividad óptica del isómero del gliceraldehído a partir del cual ese aminoácido puede, en teoría, sintetizarse (el D-gliceraldehído es dextrorrotatorio; L-gliceraldehído es levógiro). Los ejemplos de sustituciones de D-aminoácidos incluyen dW1P y DwLp (d minúscula y L indican D-aminoácidos, SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente).

Ensayo

Los aspectos de la divulgación se relacionan con la realización de un ensayo para determinar un nivel de CD36 en una muestra. Se puede usar cualquier ensayo conocido en la técnica para medir un nivel de CD36 (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., Eds., Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001, Current Protocols in Molecular Biology, FM Ausubel, et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. La tecnología de microarreglos se describe en Microarray Methods and Protocols, R. Matson, CRC Press, 2009, o Current Protocols in Molecular Biology, FM

Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). El nivel de CD36 puede ser un nivel de ARNm y/o un nivel de proteína. En algunas realizaciones, el nivel de CD36 es un nivel de proteína. Los ensayos para detectar ARNm de CD36 incluyen, entre otros, análisis de transferencia Northern, RT-PCR, tecnología de secuenciación, hibridación in situ de ARN (utilizando, por ejemplo, sondas de ADN o ARN para hibridar con moléculas de ARN presentes en la muestra), RT-PCR in situ (por ejemplo, como se describe en Nuovo GJ, et al. *Am J Surg Pathol.* 1993, 17: 683-90; Komminoth P, et al. *Pathol Res Pract.* 1994, 190: 1017-25), y microarreglos de oligonucleótidos (por ejemplo, mediante hibridación de secuencias de polinucleótidos derivadas de una muestra con oligonucleótidos unidos a una superficie sólida (por ejemplo, una oblea de vidrio) con ubicaciones direccionables, tales como una micromatriz Affymetrix (Affymetrix®, Santa Clara, CA)). Los métodos para diseñar parejas de unión de ácidos nucleicos, tales como sondas, son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las parejas de unión de ácido nucleico se unen a una parte o una secuencia de ácido nucleico completa de CD36, siendo la secuencia identificable con las secuencias de CD36 proporcionadas en el presente documento.

Los ensayos para detectar niveles de proteína CD36 incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos (también denominados en este documento como basados en inmunidad, o ensayos basados en inmunidad por ejemplo, ensayos de transferencia Western, inmunohistoquímica y ELISA), espectrometría de masas y ensayos basados en múltiples perlas. Dichos ensayos para la detección del nivel de proteínas son bien conocidos en la técnica. Pueden diseñarse parejas de unión para la detección de proteínas usando métodos conocidos en la técnica y como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las parejas de unión a la proteína CD36, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD36, se unen a una parte o una secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD36. Otros ejemplos de métodos de detección y cuantificación de proteínas incluyen inmunoensayos multiplexados como se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6939720 y 8148171, y la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 2008/0255766, y los microarreglos de proteínas como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 2009/0088329.

En algunas realizaciones, la muestra obtenida de un sujeto es una biopsia de tumor y el ensayo para detectar los niveles de proteína CD36 es un inmuno ensayo realizado en la biopsia del tumor.

Se contempla cualquier pareja de unión adecuada para CD36 para la detección de un nivel de CD36. En algunas realizaciones, la pareja de unión es cualquier molécula que se una específicamente a una proteína CD36. Como se describe en el presente documento, "se une específicamente a una proteína CD36" significa que es más probable que la molécula se una a una porción o la totalidad de una proteína CD36 que a una porción o la totalidad de una proteína que no es CD36. En algunas realizaciones, la pareja de unión es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como Fab, F(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos sFab, F(ab')₂, fragmentos Fd, scFv, o fragmentos de dAb. Los métodos para producir anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, Nueva York, (1990), y Roitt et al., "Immunology" (2ª Ed.), Gower Medical Publishing, Londres, Nueva York (1989), los documentos WO2006/040153, WO2006/122786 y WO2003/002609). Los compañeros de unión también incluyen otras moléculas de péptidos y aptámeros que se unen específicamente a CD36. Los métodos para producir moléculas peptídicas y aptámeros son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 2009/0075834, las patentes de los Estados Unidos Nos. 7435542, 7807351 y 7239742).

Los anticuerpos CD36 disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, N-15, SMφ, L-17, ME542, H300, 185-1G2 y V-19 de Santa Cruz Biotechnology (números de catálogo sc-5522, sc-7309, sc-13572, sc-5523, sc-9154, sc-21772 y sc-7641, respectivamente), JC63.1, FA6-152 y anti-CD36 de Abcam (números de catálogo ab23680, ab17044 y ab78054, respectivamente).

En algunas realizaciones, el compañero de unión es cualquier molécula que se una específicamente a un ARNm de CD36. Como se describe en el presente documento, "se une específicamente a un ARNm de CD36" significa que es más probable que la molécula se una a una porción o la totalidad del ARNm de CD36 (por ejemplo, mediante apareamiento de bases complementarias) que a una porción o la totalidad de un ARNm que no es de CD36 u otro ácido nucleico que no es de CD36. En algunas realizaciones, el compañero de unión que se une específicamente a un ARNm de CD36 es un ácido nucleico, por ejemplo, una sonda. Pueden diseñarse compañeros de unión usando las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de CD36, que se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, un compañero de unión a CD36 puede comprender un marcador detectable, tal como un grupo enzimáticamente activo, una molécula fluorescente, un cromóforo, una molécula luminiscente, un ligando que se une específicamente o un radioisótopo. En algunas realizaciones, también se contempla un segundo compañero de unión específico para el compañero de unión de CD36, tal como un anticuerpo secundario.

Muestra

Los aspectos de la divulgación se relacionan con la determinación de un nivel de CD6 en una muestra obtenida de un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra obtenida de un sujeto es una muestra de tumor. Como se usa en este documento, una muestra de tumor puede comprender, por ejemplo, una célula tumoral, una población de células tumorales, un fragmento de un tumor (por ejemplo, una biopsia) o un tumor completo. En algunas realizaciones, la muestra de tumor es una biopsia de tumor. En algunas realizaciones, la muestra de tumor comprende células tumorales circulantes. En algunas realizaciones, la muestra de tumor comprende ascitis. En algunas realizaciones, la muestra de tumor comprende líquido pleural. La muestra de tumor puede contener células no tumorales o tejido no tumoral (por ejemplo, una biopsia que contiene tejido normal que rodea un fragmento de tumor). En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de tejido o fluido obtenida de un sujeto. Ejemplos de muestras de fluidos son sangre, plasma, suero y orina.

Sujetos

Los aspectos de la divulgación se refieren a sujetos, tales como sujetos humanos, con cáncer. En este documento se contempla cualquier tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemias, linfomas, mielomas, carcinomas, carcinomas metastásicos, sarcomas, adenomas, cánceres del sistema nervioso y cánceres genitourinarios. Los ejemplos de tipos de cáncer incluyen leucemia linfoblástica aguda en adultos y niños, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso, cáncer de cerebro, glioma de tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, cáncer de mama masculino, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, carcinoma de origen desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, tumores de la familia Ewing, tumor celular germinal extracraneal, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de conductos biliares extrahepáticos, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales de ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hipofaringe, glioma hipotalámico y de las vías visuales, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenstrom, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer de cuello escamoso, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de pituitaria, neoplasias de células plasmáticas, blastocitos de recto, cáncer de próstata, cáncer rectal, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel no melanoma, cáncer de intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición, tumores trofoblásticos, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva o tumor de Wilms.

En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, astrocitoma o melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, astrocitoma o melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de melanoma o cáncer de pulmón.

Control y nivel de control

Los aspectos de la divulgación se refieren a la comparación de un nivel de CD36 en una muestra con un nivel de control. En algunas realizaciones, el nivel de control es un nivel de CD36 en una célula, tejido o fluido obtenido de un sujeto sano o una población de sujetos sanos. Como se usa en este documento, un sujeto sano es un sujeto que aparentemente está libre de enfermedad y no tiene antecedentes de enfermedad, tal como cáncer.

En algunas realizaciones, el nivel de control se determina a partir de una muestra obtenida de un sujeto que tiene cáncer. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el nivel de control se obtiene del mismo sujeto del que se obtiene la muestra. En algunas realizaciones, un nivel de control es un nivel de CD36 de una célula o tejido no canceroso obtenido del sujeto que tiene el cáncer.

En algunas realizaciones, un nivel de control es un nivel de CD36 que es indetectable o por debajo de un nivel de ruido de fondo obtenido usando métodos estándar de detección (por ejemplo, transferencia Western o inmunohistoquímica).

- 5 La divulgación también implica comparar el nivel de CD36 en una muestra del sujeto con un nivel o valor predeterminado, de modo que no es necesario medir un nivel de control cada vez. El nivel o valor predeterminado puede adoptar diversas formas. Puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o una media. Puede establecerse basándose en grupos comparativos, como cuando se sabe que un grupo definido no responde al tratamiento con un péptido Psap y se sabe que otro grupo definido responde al tratamiento con un péptido Psap. Puede ser un intervalo, por ejemplo, en el que la población analizada se divide
- 10 por igual (o de manera desigual) en grupos, tal como una que no responde al tratamiento con un péptido Psap, que responde algo al tratamiento con un péptido Psap y que responde altamente al tratamiento con un péptido Psap, o en cuadrantes, el cuadrante más bajo son los sujetos sin respuesta al tratamiento con un péptido Psap y el cuadrante más alto son los sujetos con la respuesta más alta al tratamiento con una respuesta al péptido Psap.
- 15 El valor predeterminado puede depender de la población particular seleccionada. Por ejemplo, una población aparentemente sana (sin cáncer detectable y sin antecedentes de cáncer) tendrá un intervalo "normal" diferente de CD36 que una población cuyos miembros tienen cáncer pero que se sabe que no responden al tratamiento con un péptido Psap. Por consiguiente, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría a la que pertenece un sujeto. Los expertos en la técnica pueden seleccionar intervalos y categorías
- 20 apropiados sin más que experimentación rutinaria.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos

Líneas celulares y células primarias

- 25 La línea celular PC3 se describió previamente (Kang et al. PNAS. 2009; 106: 12115-20). Las células PC3 se cultivaron en RPMI con FBS al 10%. Las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MCF-7 se describieron previamente (Ryu et al. PLoS one, 6, 2011). La línea celular de carcinoma de pulmón de Lewis LLC murina (proporcionada por Lea Eisenbach, Wiesmann Institute of Science, Rehovot, Israel) que expresan de manera estable RFP y luciferasa de luciérnaga (Gupta GP, Massague J. Cancer metástasis: building a
- 30 framework. Cell. 2006; 127: 679-95; Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. Science.2008; 319: 195-8; y Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer.2009; 9: 239-52), se cultivó en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Las células de melanoma B16, las células de cáncer de próstata LNCaP, las células de cáncer de páncreas AsPc1 y las células de cáncer de ovario ID8 se describieron previamente (Overwijk WW et al. B16 as a mouse model for human melanoma. Curr Protoc Immunol. Mayo de 2001; Capítulo 20: Unidad 20.1; Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res. 1983, Abril;43(4): 1809-18; Chen WH, et al. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. In Vitro 18: 24-
- 35 34, 1982; y Roby KF, et al. Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. Carcinogenesis. 2000, 21:585-591). Las células de cáncer de ovario primarias se derivaron de ascitis de
- 40 pacientes con cáncer de ovario.

Análisis de transferencia Western

- Las células se homogeneizaron en tampón de lisis (BioRad) que contenía inhibidores de proteasa (Roche Applied Science). Las muestras se hirvieron en tampón de muestreo 1×SDS y se cargaron en geles Bis-Tris NuPAGE con gradiente del 4-20% (Invitrogen). La transferencia Western se realizó usando anticuerpos
- 45 específicos para CD36 (AbCam, ab78054) o β-actina (Sigma-Aldrich).

Ensayos de proliferación celular in vitro

- La proliferación celular se midió usando el ensayo MTT (bromuro de 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en 50 µl de medio de crecimiento en placas de cultivo
- 50 de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. A continuación, se añadieron 50 µl de medio de crecimiento más reactivos de tratamiento concentrados dos veces. Después de cada punto de tiempo de tratamiento, se añadieron a cada pocillo 10 µl de solución de MTT al 5% (tamponada en PBS). Las placas se incubaron durante 4 horas más a 37 °C para permitir que el MTT se convirtiera metabólicamente en cristales de formazán en las mitocondrias celulares. Los cristales de formazán se solubilizaron finalmente añadiendo 100 µl de dodecilsulfato
- 55 de sodio al 10% en N-N-dimetilformamida al 50% a cada pocillo de la microplaca. Se midieron las absorbancias a 550 y 680 nm (correspondientes a la sal de formazán y longitudes de onda de referencia, respectivamente) usando un lector de microplacas de colorimetría. Se utilizaron como controles los pocillos que contenían solo

medio completo. Cada experimento se realizó dos veces, usando seis réplicas para cada concentración de fármaco.

Resultados

Se planteó la hipótesis de que Tsp-1 sobreexpresada por un péptido Psap puede estar actuando directamente sobre las células cancerosas, en lugar de solo a través de un mecanismo anti-angiogénico indirecto. Para probar esto, las células LLC se trataron con péptido Psap Tsp-1 recombinante o DWLPK (SEQ ID NO: 2) y se midió la proliferación celular usando un ensayo MTT. Se encontró que Tsp-1 era capaz de disminuir la proliferación celular, mientras que el péptido Psap no afectaba la proliferación celular (Figura 1A). Esto apoya la hipótesis de que Tsp-1 puede actuar directamente sobre las células cancerosas, ya que este ensayo se realizó in vitro en ausencia de vasos sanguíneos. Estos resultados también muestran que el péptido Psap solo no parece afectar la proliferación de células cancerosas, lo que respalda la hipótesis de que los péptidos Psap pueden tratar indirectamente el cáncer mediante la sobreexpresión de Tsp-1. Se demostró que las células LLC expresan CD36, un receptor de Tsp-1, lo que indica que Tsp-1 puede actuar directamente sobre las células cancerosas a través de CD36 (Figura 1B).

Se midieron los niveles de CD36 en otras líneas celulares para ver si otros tipos de cáncer también expresaban CD36. Los niveles de CD36 se midieron en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-231, MCF-7), cáncer de ovario (ID8), melanoma (B16), cáncer de próstata (PC3 y LNCaP) y cáncer de pulmón (LLC) mediante análisis de transferencia Western. Se encontró que la proteína CD36 era detectable en todas las líneas celulares probadas, con niveles particularmente altos de CD36 detectables en las líneas celulares MDA-231, MCF-7, PC3 y LLC (Figura 2). Se ha demostrado previamente que las células MDA-231, ID8, B16, PC3 y LLC responden al tratamiento con un péptido Psap in vivo.

También se examinó la línea celular pancreática AsPcl y se encontró que expresaba CD36.

Los niveles de CD36 también se midieron en células de cáncer de ovario primarias derivadas de pacientes con ascitis. La proteína CD36 fue detectable en todas las células de cáncer de ovario primarias probadas (Figura 3).

Ejemplo 2

Métodos

Ratones y líneas celulares

Todo el trabajo con animales se realiza de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales. Se obtuvieron C57BL/6J de tipo silvestre y C57BL/6-Tg transgénico GFP (ACTB-EGFP) 10sb/J a través de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Los ratones SCID CB-17 se obtuvieron a través de Charles River (Wilmington, MA).

Las líneas celulares PC3 y PC3M-LN4 se describieron previamente (14). Las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MDA-MB-LM2 se describieron previamente (Ryu et al. PLoS one, 6, 2011). La línea celular LLC/D122 de carcinoma de pulmón de Lewis murino (proporcionada por Lea Eisenbach, Wiesmann Institute of Science, Rehovot, Israel) que expresa de manera estable RFP y luciferasa de luciérnaga (Gupta GP, Massague J. Cancer metástasis: building a framework. Cell. 2006; 127: 679-95; Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. Science. 2008; 319: 195-8; y Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 2009; 9: 239-52), se cultivan en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%.

Microarreglos de tejidos e inmunohistoquímica

Las muestras de archivo (muestras de prostatectomía radical o biopsias de metástasis) se recuperan de archivos del Departamento de Patología, The Gade Institute, Haukeland University Hospital. Las muestras de prostatectomía fijadas con formalina se incrustaron en parafina y se estudiaron mediante secciones de etapas de montaje completas a intervalos de 5 mm. Se construyeron microarreglos de tejido (TMA) seleccionando tres núcleos de tejido (0,6 mm de diámetro) del área de mayor grado del tumor en cada caso.

Se desparafinaron secciones delgadas de parafina (5 µm) del bloque de parafina de TMA con xileno/etanol antes de la recuperación del epítipo de microondas inducido por calor en tampón de citrato (pH 6,0) durante 20 minutos, y se incubaron con un anticuerpo CD36 durante 60 minutos a temperatura ambiente. La inmunotinción se realiza con el equipo de tinción automática DAKO con el método de polímero en cadena EnVision (Dako Cytomation, Copenhagen, Dinamarca) como sistema de detección. La localización del antígeno se logra mediante la reacción de diaminobencidina peroxidasa DAB, contrateñida con hematoxilina.

La inmunotinción se estima semicuantitativamente y se obtiene un índice de tinción (SI) como producto de la intensidad de tinción (0-3) y se calcula la proporción de células tumorales inmunopositivas (<10% = 1, 10-50% = 2, > 50% = 3). El índice de tinción (intervalo 0-9) es una escala categórica, en la que se espera alguna variación dentro de cada categoría.

5 Inactivación de CD36 en células tumorales

Los niveles de CD36 se reducen en líneas de células cancerosas utilizando vectores retrovirales o lentivirales que codifican los miARN o ARNph que se dirigen a CD36. La eficiencia de inactivación se prueba mediante análisis de qPCR. El ARN total se extrae utilizando el kit de extracción de ARN PicoPure (Arcturus) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se convierte en ADNc utilizando la supermezcla de ADNc qScript™ (Quanta Biosciences). La qPCR se realiza con cebadores y mezcla maestra iQTM SYBER Green (Biorad, Hercules, CA). Un protocolo estándar de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 minutos y el análisis de la curva de fusión se aplica en un sistema en tiempo real CFX96 de BioRad (BioRad) junto con el software Bio-Rad-CFX Manager. La abundancia relativa de cada transcripto en comparación con el control se calcula utilizando el método delta-Ct.

Ensayos de proliferación celular in vitro

La proliferación celular se mide usando el ensayo MTT (bromuro de 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich). Las células se siembran en 50 µl de medio de crecimiento en placas de cultivo de 96 pocillos y se dejan adherir durante la noche. A continuación, se añadieron 50 µl de medio de crecimiento más reactivos de tratamiento concentrados dos veces. Después de cada punto de tiempo de tratamiento, se añadieron a cada pocillo 10 ml de solución de MTT al 5% (tamponada en PBS). Las placas se incubaron durante 4 horas más a 37 °C para permitir que el MTT se convirtiera metabólicamente en cristales de formazán en las mitocondrias celulares. Los cristales de formazán se solubilizaron finalmente añadiendo 100 µl de dodecilsulfato de sodio al 10% en N-N-dimetilformamida al 50% a cada pocillo de la microplaca. Se midieron las absorbancias a 550 y 680 nm (correspondientes a la sal de formazán y longitudes de onda de referencia, respectivamente) usando un lector de microplacas de colorimetría. Se utilizaron como controles los pocillos que contenían solo medio completo. Cada experimento se realizó dos veces, usando seis réplicas para cada concentración de fármaco.

Ensayo de metástasis, obtención de imágenes de bioluminiscencia y análisis

Para la metástasis experimental, se inyectan ratones C57BL/6 de 7 semanas a través de la vena de la cola con 1×10^5 células LLC marcadas con luciferasa. Para inyecciones de células de cáncer de mama ortotópicas, se inyectan 5×10^6 células MDA-MB-231 o su variante metastásica MDA-MB-LM2 en las almohadillas de grasa de ratones SCID CB-17 en un volumen de 0,1 ml. El crecimiento del tumor y las metástasis pulmonares (después de la resección del tumor primario) se controlaron mediante imágenes de bioluminiscencia de animales vivos (Xenogen) una vez por semana. Para las inyecciones de células de cáncer de próstata ortotópicas, se inyectaron 2×10^6 LN4 o células viables en la glándula prostática de los ratones.

Para la determinación in vivo de la carga metastásica, se anestesió a los ratones y se les inyectó intraperitonealmente 75 mg/kg de D-luciferina (100 µl de 30 mg/ml en PBS). El crecimiento metastásico se controló a lo largo del tiempo utilizando imágenes de bioluminiscencia realizadas con ratones en posición supina 5 minutos después de la inyección de D-luciferina con un sistema Xenogen IVIS acoplado al software de adquisición y análisis Living Image (Xenogen). Para los gráficos BLI, se calculó el flujo de fotones para cada ratón utilizando la misma región circular de interés que abarca el tórax del ratón.

Administración del péptido Psap

Se tratan ratones de 8 semanas con un péptido Psap (tal como DWLPK (SEQ ID NO: 2), DWLP (SEQ ID NO: 3), o una versión modificada del mismo), diluido en PBS, a una dosis de 30 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal hasta por dos semanas.

Resultados

Los niveles de CD36 se miden en muestras de tejido de sujetos humanos con cáncer.

Los niveles de CD36 se reducen en líneas de células cancerosas y estas líneas de células con CD36 reducido se inyectan en ratones. A continuación, se administra a los ratones un péptido Psap. Se controlan el crecimiento tumoral y la carga metastásica. Se espera que la inactivación de CD36 en las células cancerosas reduzca la actividad anticancerígena de un péptido Psap in vivo.

Ejemplo 3

Métodos

Salvo que se indique lo contrario, los métodos usados en el Ejemplo 3 son los mismos que los métodos usados en los Ejemplos 1 y 2. Las líneas celulares probadas para la expresión de CD36 fueron pancreáticas (AsPC1), de ovario (DF-14 e ID-8), de mama (MDA-MB231 y LM2), de próstata (PC3, PC3-M-LN4, LN-CAP y LN-CAP-LN3), de melanoma (B16-B16) y cáncer de pulmón (LLC). Todas estas líneas celulares son conocidas en la técnica y/o están disponibles comercialmente.

Se trataron células de cáncer de ovario que expresaban CD36 con control o trombospondina (Tsp-1, 100 ng, 500 ng o 1000 ng) y se midió el porcentaje de células viables a las 0 horas o 48 horas.

Para el modelo de ratón con cáncer de ovario, se inyectaron intraperitonealmente 1 millón de células de cáncer de ovario que expresan luciferasa. El tratamiento se inició 17 días después con cisplatino (4 mg/kg QOD), el péptido Psap dWIP (SEQ ID NO: 47, 40 mg/kg QD), una combinación de cisplatino y péptido Psap, o PBS QD. La intensidad de la luciferasa se midió varios días comenzando aproximadamente el día 17 y se midió a lo largo del tiempo.

Para el modelo de ratón con cáncer de páncreas, se inyectaron 1×10^6 células pancreáticas humanas AsPcl en el páncreas de ratones SCID. Los ratones se trataron con un control o con el péptido Psap dW1P (SEQ ID NO: 47, 20 mg/kg/día o 40 mg/kg/día). El tratamiento comenzó el día 25 y continuó diariamente durante 21 días. A continuación, se sacrificó a los ratones y se midió la masa del tumor primario. También se midió la presencia o ausencia de ascitis.

Para el modelo de ratón con melanoma, se inyectaron células B16-B16 en ratones. Los ratones se trataron con péptido Psap dW1P (SEQ ID NO: 47, 10 o 40 mg/kg) o control. El volumen del tumor se midió a lo largo del tiempo hasta aproximadamente 20-25 días después de la inyección de células.

Resultados

Se ensayaron múltiples líneas de células cancerosas para determinar la expresión de CD36. Se encontró que la proteína CD36 era detectable en todas las líneas celulares probadas, con niveles particularmente altos de CD36 detectables en las líneas celulares AsPC1, DF-14, MDA-MB231 y PC3 (Figura 5).

Se demostró que las células de ovario que expresan CD36 eran sensibles a la muerte celular mediada por Tsp-1 de una manera dependiente de la dosis (Figura 6).

Se inyectaron dos líneas celulares CD36 "altas" (células de cáncer de ovario y células de cáncer de páncreas AsPC) y una línea celular CD36 "baja" (células cancerosas B16-B6) en ratones para estudiar los efectos de los péptidos Psap sobre el crecimiento tumoral y metástasis. Se encontró que los modelos de cáncer de CD36 "alto" retrocedieron en respuesta al tratamiento con péptido Psap (Figura 5 y 7). El modelo de cáncer de ovario también mostró regresión de la enfermedad metastásica (Figura 5). El modelo de cáncer de páncreas también mostró inhibición de la metástasis porque solo 1 de 19 ratones tratados con un péptido Psap forma ascitis, mientras que 4 de 10 ratones tratados con el control forma ascitis. En el modelo de melanoma CD36 "bajo", se encontró que el tratamiento con un péptido Psap inhibía el crecimiento del tumor primario pero no provocaba la regresión del tumor (Figura 8). Estos resultados muestran que los cánceres CD36 "altos" tienen más probabilidades de responder fuertemente al tratamiento con péptido Psap (por ejemplo, regresión del tumor primario y/o metástasis), mientras que los cánceres CD36 "bajos" tienen más probabilidades de tener una respuesta más débil (por ejemplo, inhibición de tumor primario en lugar de regresión).

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la respuesta de un sujeto al tratamiento con un péptido Psap, comprendiendo el método: determinar un nivel de CD36 en una muestra obtenida de un sujeto que tiene cáncer, en el que un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con un nivel de control indica que el sujeto responde a o es probable que responda al tratamiento con un péptido Psap, en el que el péptido Psap consiste en la secuencia de aminoácidos DWLPK (SEQ ID NO: 2) o una variante de sustitución de aminoácidos de la misma, en el que la sustitución de aminoácidos es:
 - a) Tirosina (Y) por Triptófano (W);
 - b) una sustitución de aminoácidos por Leucina (L) seleccionada entre Valina (V) o Alanina (A), o un aminoácido no canónico de tamaño similar, o un derivado de los mismos;
 - c) Arginina (R) por Lisina (K);
 - d) un isómero D de ácido aspártico (D) por un isómero L de ácido aspártico (D) y/o un isómero D de leucina (L) por un isómero L de leucina (L);
 - e) un isómero D de triptófano (W) por un isómero L de triptófano (W) y/o un isómero D de prolina (P) por un isómero L de prolina (P); o combinaciones de los mismos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de CD36 en la muestra se determina mediante la realización de un ensayo.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el método comprende además:
 - identificar al sujeto con un nivel elevado de CD36 en la muestra en comparación con el nivel de control como sensible o con probabilidad de ser sensible al tratamiento con un péptido Psap.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de control es un nivel de CD36 de una célula o tejido no canceroso obtenido del sujeto que tiene el cáncer; en el que el nivel de control es un nivel de CD36 en una célula o tejido obtenido de un sujeto sano o una población de sujetos sanos; o en el que el nivel de control es un nivel predeterminado.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de CD36 es un nivel de proteína CD36.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, astrocitoma o melanoma.
7. Una composición para uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer caracterizado por un nivel elevado de CD36 en una muestra en comparación con un nivel de control, comprendiendo la composición un péptido Psap, en el que el péptido Psap consiste en la secuencia de aminoácidos DWLPK (SEQ ID NO: 2) o una variante de sustitución de aminoácidos de la misma, en el que la sustitución de aminoácidos es:
 - a) Tirosina (Y) por Triptófano (W);
 - b) una sustitución de aminoácidos por Leucina (L) seleccionada entre Valina (V) o Alanina (A), o un aminoácido no canónico de tamaño similar, o un derivado de los mismos;
 - c) Arginina (R) por Lisina (K);
 - d) un isómero D de ácido aspártico (D) por un isómero L de ácido aspártico (D) y/o un isómero D de leucina (L) por un isómero L de leucina (L);
 - e) un isómero D de triptófano (W) por un isómero L de triptófano (W) y/o un isómero D de prolina (P) por un isómero L de prolina (P); o combinaciones de los mismos.
8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el nivel de control es un nivel de CD36 de una célula o tejido no canceroso obtenido del sujeto que tiene cáncer; en la que el nivel de control es un nivel de CD36 en una célula o tejido obtenido de un sujeto sano o una población de sujetos sanos; o en la que el nivel de control es un nivel predeterminado.
9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el nivel de CD36 es un nivel de proteína CD36.

10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, astrocitoma o melanoma.
- 5 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el péptido Psap es un péptido cíclico.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que el aminoácido no canónico de tamaño similar es metilvalina, metil-leucina o sarcosina.
- 10 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en el que la muestra es una muestra de tumor.

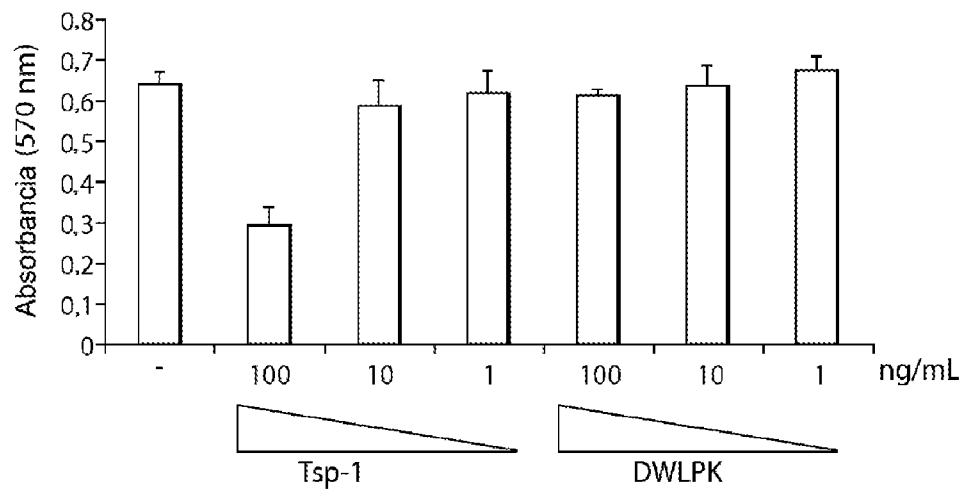


Fig. 1A

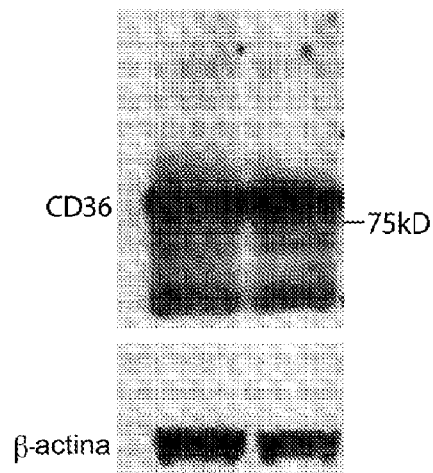


Fig. 1B

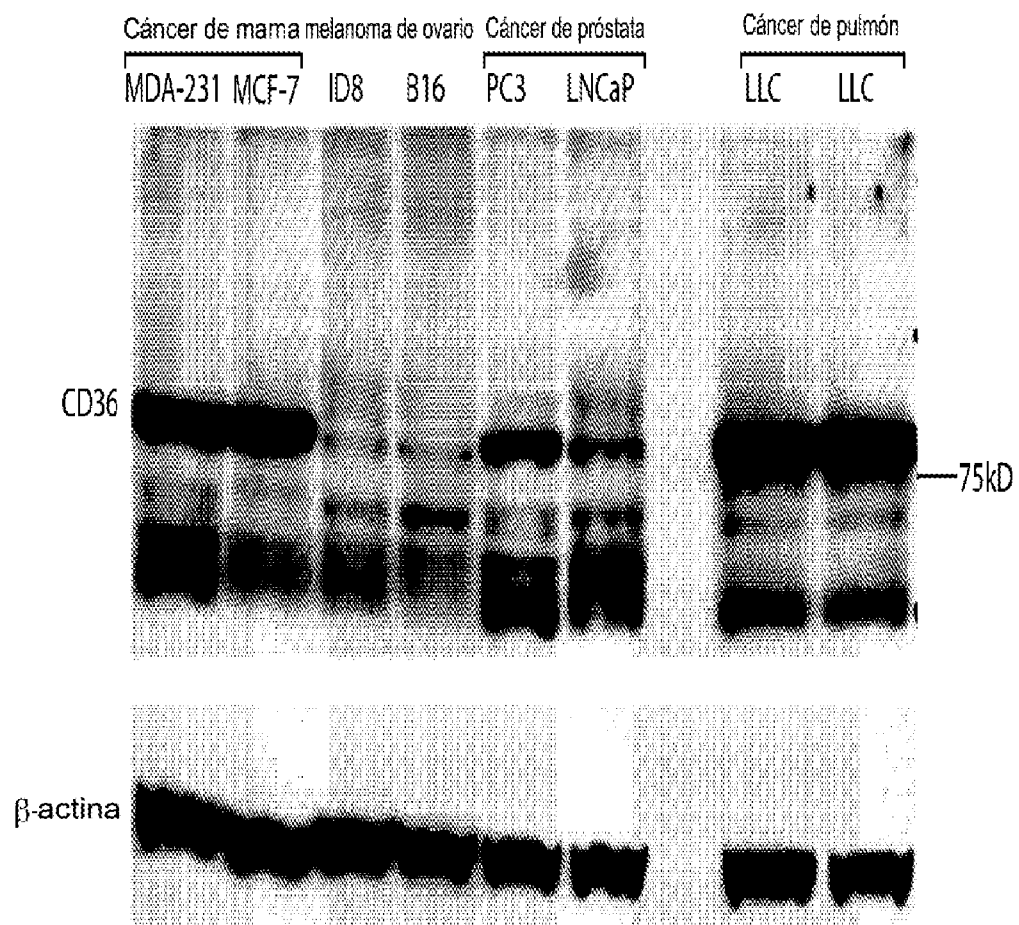


Fig. 2

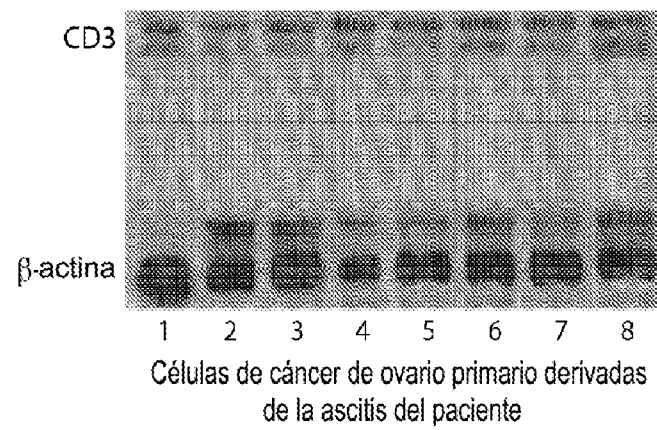


Fig. 3

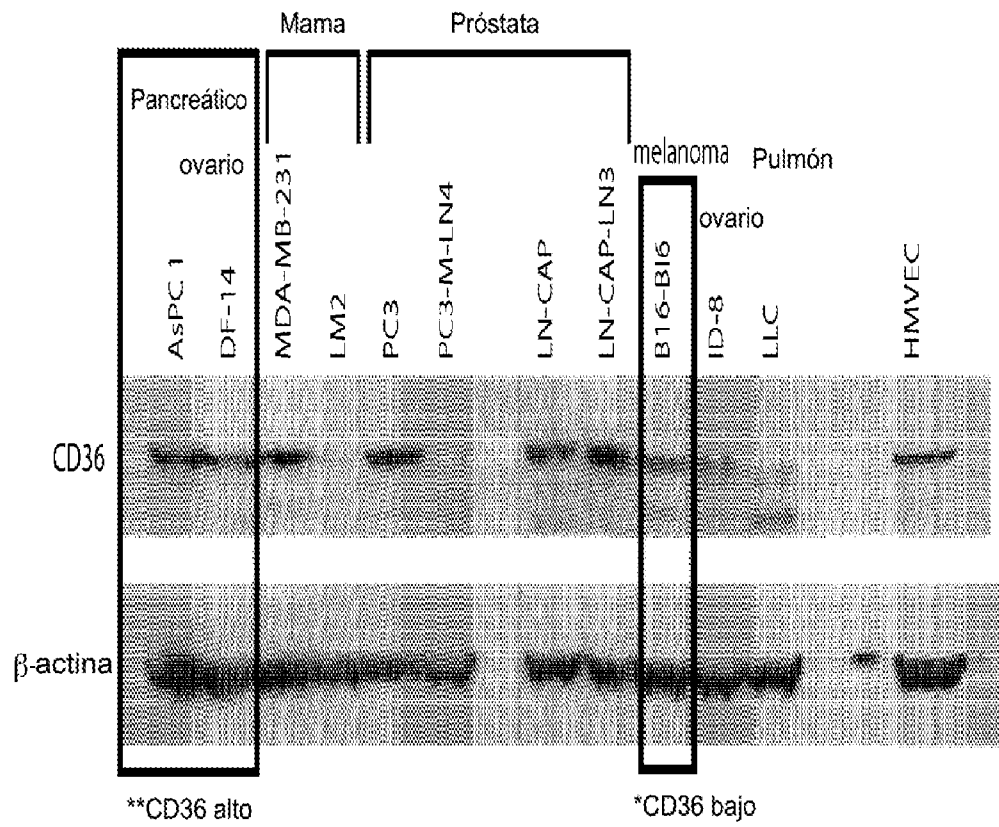


Fig. 4

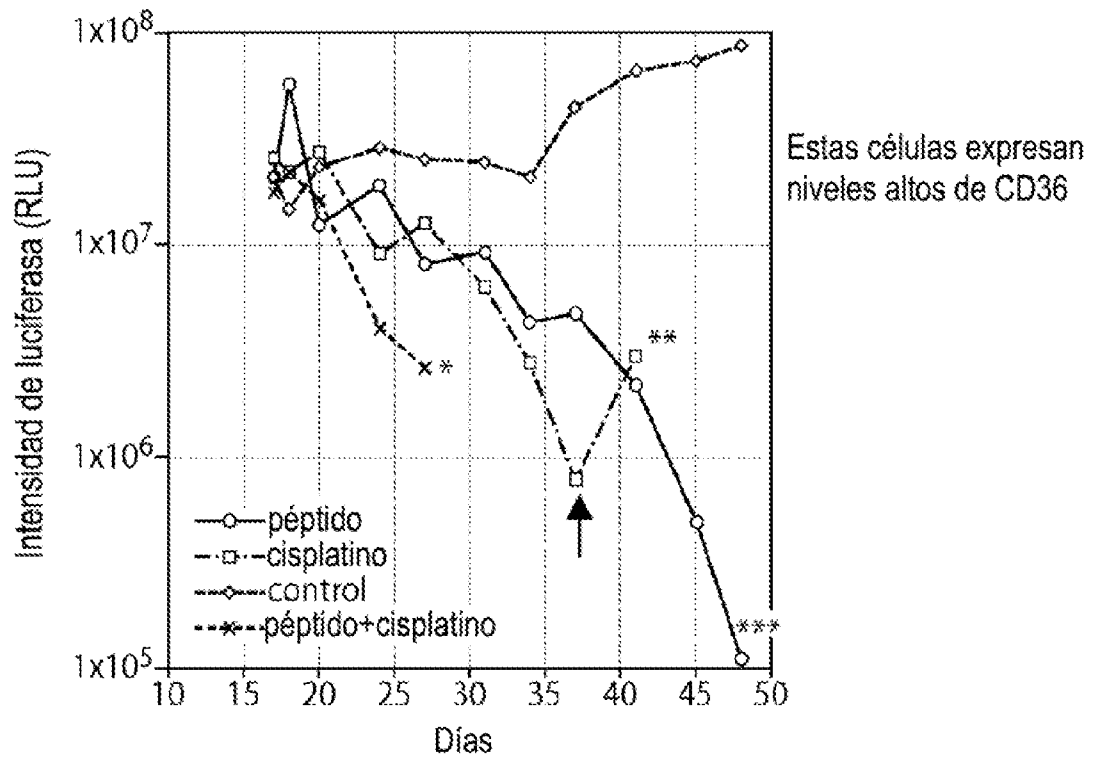


Fig. 5

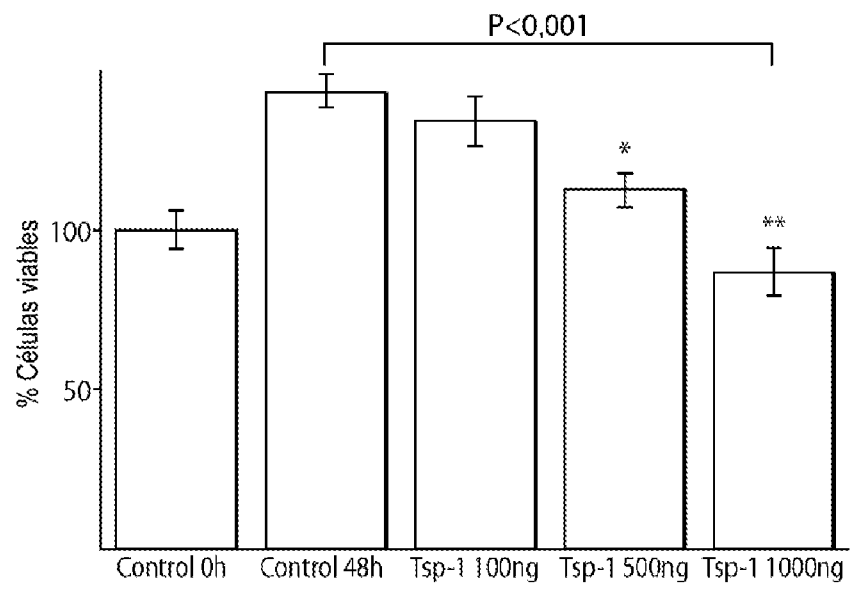


Fig. 6

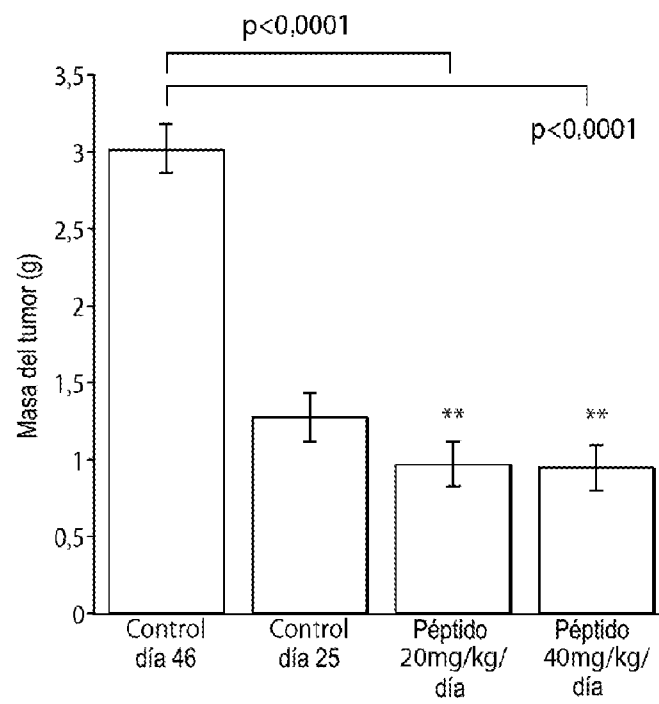


Fig. 7

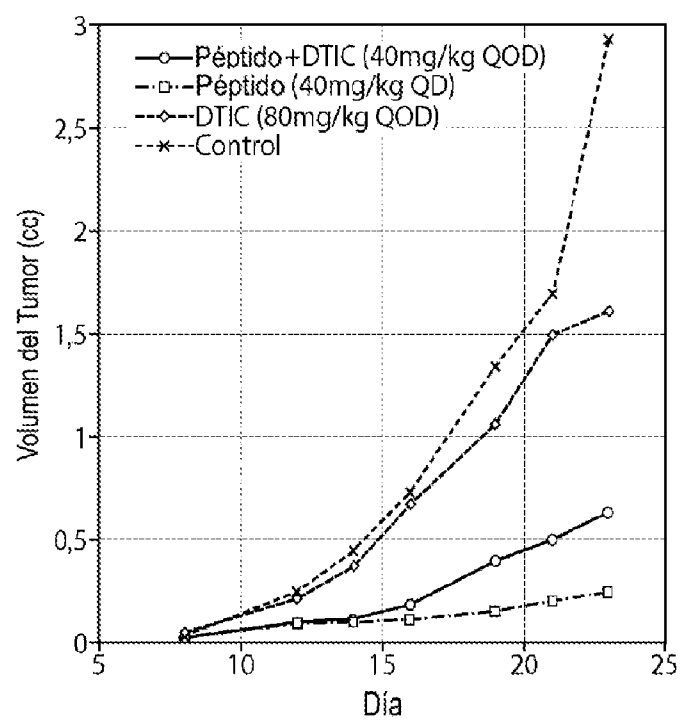


Fig. 8