

# Identificación de péptidos miméticos al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal específico por el EGF, CB-EGF1

Yaquelin Puchades, Ariana G Ojalvo, Yanet García, Glay Chinae, Haydée Gerónimo, Nelson S Vispo

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: ariana.garcia@cigb.edu.cu

## RESUMEN

Como parte de un estudio integral de estructura y función, se caracterizó el anticuerpo monoclonal CB-EGF1, específico por el EGF, con el empleo de la tecnología de presentación de péptidos en la cápsida de los bacteriófagos filamentosos. Los datos de este trabajo demuestran que el anticuerpo CB-EGF1 reconoce un epítipo conformacional en la molécula de EGF compuesto por los aminoácidos S9, H10, Y13, K28, E40 y R41. Las secuencias de péptidos identificadas mimetizan la zona de interacción del EGF con la cadena beta del REGF. Los péptidos sintéticos F22-54 y F22-55 compiten con el EGF por la unión al anticuerpo CB-EGF1, según se demostró mediante ELISA, pero no presentan actividad sobre el sistema EGF-REGF.

**Palabras clave:** EGF, REGF, presentación en fagos, bibliotecas combinatorias

*Biotecnología Aplicada 2005;22:199-202*

INVESTIGACIÓN

## ABSTRACT

**Identification of peptide mimics of the epitope recognized by CB-EGF1, a monoclonal antibody EGF specific.** As part of an integral structure and function study, we characterized the natural epitope on the EGF recognized by the CB-EGF1 monoclonal antibody, by using peptides displayed on the coat protein of filamentous bacteriophages. Data analyzed demonstrated that the CB-EGF1 monoclonal antibody recognizes a conformational epitope, comprising aminoacids S9, H10, Y13, K28, E40 and R41. The identified peptide sequences are mimicking the region on the EGF interacting with the b-chain of the EGF receptor (EGFR). Synthetic peptides F22-54 and F22-55 compete with the EGF for binding to the CB-EGF1 antibody, as demonstrated by ELISA, but lacking biological activity in the EGF-EGFR system.

**Key words:** EGF, EGFR, phage display, combinatorial libraries

## Introducción

La identificación de los epítipos reconocidos por los anticuerpos monoclonales (AcM) tradicionalmente se ha realizado probando colecciones de fragmentos peptídicos derivados del antígeno [1, 2], o empleando colecciones de péptidos sintéticos o de fragmentos de ADN complementario expresados *in vitro* [3]. Una alternativa más ventajosa que estas técnicas químicas o biológicas es la utilización de bibliotecas peptídicas presentadas en la superficie de fagos filamentosos. Este procedimiento permite identificar y caracterizar los péptidos seleccionados, aun cuando se recuperen solo pequeñas cantidades en el proceso de selección (en teoría, hasta el nivel de una sola partícula) [4]. Estos péptidos que mimetizan al antígeno natural se denominan fagotopos.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un péptido que regula el crecimiento [5] con un efecto estimulante en la proliferación epidérmica y un efecto inhibitorio en la secreción ácido-gástrica [6]. Constituye un polipéptido de 53 aminoácidos (6 045 Da) [7] que se une con elevada afinidad al dominio extracelular de receptores específicos de la superficie celular nombrados receptores de EGF (Rs-EGF), lo cual es esencial para activar el dominio tirosina-quinasa del receptor e iniciar la señal de transducción, que resulta en la síntesis de ADN y la proliferación celular [6, 8]. La activación del REGF es importante para el desarrollo de los fenotipos de proliferación, maduración, sobrevivencia, apoptosis, angiogénesis y metástasis [6].

Debido a la importancia del sistema EGF-REGF en la patogénesis de varios cánceres, uno de los retos más importantes es la búsqueda de estrategias inhibitorias de esta unión, la que ha llevado al desarrollo de agentes que selectivamente inhiben este proceso, entre los que se encuentran anticuerpos e inhibidores tirosina-quinasa [9, 10]. Como parte de un trabajo integral en estudios de estructura y función de diferentes moléculas, se caracterizaron los sitios de unión y la especificidad detallada de un AcM neutralizante anti-EGF (CB-EGF1), previamente obtenido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) [11]. Con vistas a identificar el epítipo reconocido por este AcM, se utilizaron dos bibliotecas de péptidos lineales (pVIII-9aa) y cíclicos (pVIII-9CaaC), respectivamente, presentados como fusión a la proteína mayoritaria pVIII de la cápsida de los fagos filamentosos de tipo f1 [12]. Como resultado, se identificó el sitio de unión del AcM CB-EGF1 y se obtuvieron péptidos con capacidad de unión a esta molécula. Estos péptidos se evaluaron en ensayos de unión al AcM CB-EGF1 y en experimentos *in vitro* de actividad biológica para EGF.

## Materiales y métodos

### Selección a partir de las bibliotecas de péptidos presentadas en fagos

Los procesos de selección, con las bibliotecas pVIII-9aa y pVIII-9CaaC, se realizaron tras modificar la técnica de *biopanning* [13], descrita por Felici y cols. 1991

1. Geysen H, Rodda S, Mason T, Tribbick G, Schooes P. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987;102:259-74.
2. Appel JR, Pinilla C, Niman H, Houghten R. Elucidation of discontinuous linear determinants in peptides. *J Immunol* 1990; 144:976-83.
3. Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992;151:237-44.
4. Pini A, Giuliani A, Ricci C, Runci Y, Bracci L. Strategies for the construction and use of peptide and antibody libraries displayed on phages. *Curr Protein Pept Sci* 2004;5:487-96.
5. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:21-6.
6. Firth LC, Baker NE. EGF receptor signaling: a prickly proposition. *Curr Biol* 2003;13:R773-4.
7. Leahy DJ. Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors. *Adv Protein Chem* 2004;68:1-27.
8. Milano M. EGF receptor in head and neck cancer. *Cancer Radiother* 2005;9:51-4.

[12]. Se revistieron perlas de poliestireno ( $\varnothing$  6.4 mm, Precision Plastic Ball Co., Chicago, EE.UU) con el AcM CB-EGF1, a una concentración de 10 mg/mL en solución de recubrimiento (50 mM carbonato de sodio, pH 9.6) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Las perlas se bloquearon con una solución que contenía solución salina regulada con fosfato (SSTF) con 10 mg/mL de seroalbúmina bovina (SAB), durante 4 h a 4 °C. Después de varios lavados con SSTF que contenía 0.5% de Tween 20 (SSTF-Tween 20), las perlas se preincubaron con aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  M13K07 UT-Kan<sup>R</sup> (unidades de traducción resistentes a kanamicina) en 1 mL de SSTF-Tween 20 que contenía 1 mg/mL SAB (SSTF-Tween 20/SAB) durante 4 h a 4 °C. En el primer ciclo de selección se emplearon aproximadamente  $3.2 \times 10^{10}$  UT-Amp<sup>R</sup> (unidades de traducción resistentes a ampicilina) de las bibliotecas pVIII-9aa y pVIII-9CaaC, respectivamente. Las mezclas se incubaron durante toda la noche con agitación a 4 °C. Las fracciones no adsorbidas (N) se eliminaron y las perlas se lavaron extensivamente con SSTF-Tween 20. Las fracciones adsorbidas (A) se recuperaron mediante incubación con 0.1 N HCl, 1 mg/mL SAB, pH 2.2. Las mezclas de fagos eluidos, se neutralizaron inmediatamente con 2M Tris, pH 9 y se utilizaron en otros ciclos de selección.

#### Inmunoidentificación de clones individuales

Las preparaciones individuales de fago se obtuvieron mediante la infección de 0.4 mL de un cultivo de la cepa TG1 de *E. coli*, con  $10^4$  UT-Amp<sup>R</sup> de las mezclas de fagos adsorbidos, seguida de superinfección con  $10^{11}$  UT-Kan<sup>R</sup> del fago auxiliador M13K07 y crecimiento en un medio LB suplementado con 100 mg/mL Amp, 70 mg/mL Kan y 0.1 mM IPTG durante 5 h a 37 °C con agitación vigorosa. La suspensión de bacterias y fagos se centrifugó, y el sobrenadante fue precipitado con 4% PEG 8 000 en 0.5 M NaCl. Los clones positivos se caracterizaron posteriormente mediante un ELISA antifago, con el empleo del AcM CB-EGF1 (3 mg/mL) como elemento de captura y un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa como molécula de detección.

#### Secuenciación de ADN

La secuencia nucleotídica de los clones de fago se determinó según el método de los dideoxinucleótidos [14]. Se utilizó el oligonucleótido que hibrida en la región -40 de los vectores derivados del bacteriófago M13.

#### Síntesis de péptidos

Los péptidos F22-54, F22-55 y F21-34 se obtuvieron en el Departamento de Síntesis Química del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

#### Inmunorreconocimiento de los péptidos sintéticos F22-54 y F22-55 por el AcM CB-EGF1

Las placas de poliestireno (High Binding, Costar, EE.UU) se trataron con 100  $\mu$ L por pozo de una solución de glutaraldehído al 2% , durante 2 h a 37 °C. Posteriormente se recubrió con los péptidos F22-54 y F22-55 a una concentración de 10 mg/mL en solución de recubrimiento (50 mM carbonato de sodio, pH 9.6), durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Después del lavado de las placas con SSTF-Tween 20 se añadió la solución de bloqueo (SSTF-Tween 20 que contenía

2% de SAB), y se incubó durante 2 horas a 37 °C en cámara húmeda. A continuación se lavaron las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el anticuerpo CB-EGF1 (1:1 000). Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa preparado 1:5 000 (Amersham Biosciences). Luego de lavar las placas, se añadieron 100  $\mu$ L por pozo de la solución sustrato de la peroxidasa (ortofenilendiamina 1 mg/mL en 0.1 M ácido cítrico, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.0) que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. La reacción de color se detuvo con 50  $\mu$ L de 2.5 M ácido sulfúrico y la absorbancia se determinó a 492 nm en un lector de placas de microELISA Multiskan System (Titerek, Helsinki, Finlandia). Cada muestra se analizó por duplicado. El experimento se validó mediante los controles positivo (EGF), negativo (péptido no relacionado, F21-34) y blanco.

#### ELISA de competencia

Las condiciones del ELISA de competencia se establecieron previamente. Las placas de poliestireno (High Binding, Costar, EE.UU) se recubrieron con 100  $\mu$ L por pozo de la solución que contenía EGFhr a una concentración 125 ng/mL en solución de recubrimiento (50 mM carbonato de sodio, pH 9.6), durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Después del lavado de las placas con SSTF-Tween 20, se añadió la solución de bloqueo (SSTF-Tween 20 que contenía 2% BSA) y se incubó durante 2 horas a 37 °C en cámara húmeda. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con las muestras del anticuerpo CB/EGF1 (1:20 000) previamente incubado con 10  $\mu$ g de los péptidos F22-54 y F22-55 por separado, durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción de detección se realizó igual que en el ensayo anterior. Como control positivo del ensayo se utilizó el AcM CB-EGF1 sin previa incubación con los péptidos.

#### Ensayo de proliferación celular

A partir de la línea de células de fibroblastos murinos 3T3 A31 (ECACC) se procedió a sembrar placas de 96 pozos a razón de 15 000 células/pozo y se incubaron durante 24 horas. Una vez alcanzado el crecimiento deseado, se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con SSTF, se añadió un medio fresco sin suero y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio y se añadieron las diferentes dosis del EGF, utilizado como material de referencia (EGFhr-0601, CIGB, La Habana, Cuba), y de las muestras de péptidos que se debían ensayar. Luego de 24 horas de incubación, se tiñeron las placas con una solución de cristal violeta. Pasados 3 minutos, se eliminó el colorante y las placas se lavaron con agua corriente. El colorante se disolvió añadiendo 100  $\mu$ L de una solución de ácido acético al 10%. La absorbancia se determinó a 578 nm.

#### Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos de inmunorreconocimiento de los péptidos por el AcM CB-EGF1, ELISA de competencia y proliferación celular se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Para analizar la significación estadística de los datos del ensayo de ELISA de competencia, se utilizó la prueba de comparaciones

9. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21: 2237-46.

10. Miller VA, Johnson DH, Krug LM, Pizzo B, Tyson L, Perez W. Pilot trial of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib plus carboplatin and paclitaxel in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2094-100.

11. Freyre FM, Vázquez J, Duarte C, Ferrá E, López I, Arteaga N. Anticuerpos monoclonales que reconocen los factores de crecimiento epidérmico humano y murino. *Interferón y Biotecnología* 1989; 6(1):32-46.

12. Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, Jappelli R, Cesareni G: Selection of Antibody Ligands from a Large Library of Oligopeptides Expressed on a Multivalent Exposition Vector. *J Mol Biol* 1991;222: 301-10.

13. Parmley SF, Smith GP: Antibody-selectable Filamentous fd Phage Vectors; Affinity Purification of Target Genes. *Gene* 1988;73:305-18.

múltiples de Duncan. El valor de  $p < 0.05$  se interpretó para denotar la diferencia estadística significativa (\*).

## Resultados y discusión

El AcM CB-EGF1 pertenece a la subclase IgG1 murina, es específico y neutralizante para el EGF y solo es capaz de reconocer la molécula en su conformación nativa [11]. Este AcM se utilizó como elemento de captura en procesos de selección con el empleo de las bibliotecas de péptidos pVIII-9aa y pVIII-9CaaC presentados en la superficie de fagos filamentosos. Con ambas bibliotecas se observó un incremento en la cantidad de fagos adsorbidos desde el primero hasta el tercer ciclo de selección (Tabla 1), lo cual indica la amplificación de fagos específicos por el AcM CB-EGF1.

La capacidad de unión de clones individuales de fagos se confirmó mediante ELISA antifago. Con un oligonucleótido que híbrida en la región -40 de los vectores tipo M13, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los clones positivos. Estas secuencias de 27 pares de bases se tradujeron a aminoácidos y se obtuvo la secuencia de los péptidos presentados en el extremo amino de la proteína pVIII (Tabla 2).

Las secuencias de los péptidos lineales se alinearon según su similitud y se obtuvo el péptido SKFDR como secuencia consenso. En el análisis del modelo estructural del EGF se observó que en la misma región de 10 A° se encontraban los residuos obtenidos en la región consenso. En el lugar que ocupaba la F en estos clones se encontró una Y, y en sustitución del D presente en el consenso, se encontró una E. Estas dos sustituciones son de las más comunes en estos trabajos, ya que los péptidos obtenidos no son la copia fiel del antígeno. Los aminoácidos se reordenaron a partir del uso de cadenas laterales muy similares, como el cambio de F por Y, o a partir de las sustituciones de aminoácidos que presentan la misma carga, como D por E [15].

Con estos datos se logró identificar la zona que se muestra en la figura 1 como el sitio de reconocimiento del anticuerpo CB-EGF1 en la molécula de EGF. Este

Tabla 1. Títulos de las fracciones absorbidas (UT Amp<sup>5</sup>/mL) durante los procesos de selección.

Biblioteca	Ciclos de selección		
	1	2	3
pVIII9aa	$1.4 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	$4.9 \times 10^8$
pVIII9CaaC	$8.0 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$

Tabla 2. Secuencias de péptidos obtenidos después de los procesos de selección con las bibliotecas pVIII9aa (lineal) y pVIII9CaaC (cíclica).

Biblioteca	
pVIII9aa	pVIII9CaaC
---AKFNDYWRW---	CPPAKFSPSVC
---SKFDAPRL--P	CHKFDQLQRPC
---LKFNRPPG-L--	CSSLDRFWAC
--QRSFDGP-P----	CSLARSKFSAC
EHALKFGP-----P	CTAHERKFVAC
-SLAKFGPPP-----	CPPAKFSQAC
---SKFDAPRLP---	CTHLSADSTSC
----KFGPKTVLP--	CANRFDEKALC
Cons---SKFDR-----	CRRWSASTKAC

epítipo se compone por los aminoácidos S9, H10, Y13, K28, E40 y R41.

Este epítipo topográfico incluye dos aminoácidos fundamentales en la interacción del EGF con su receptor la Y13 y la R41 (Figura 2). Estas interacciones definen el carácter neutralizante de este anticuerpo, el cual se caracterizó previamente en experimentos de inhibición de la unión del EGF a su receptor [11]. Los péptidos obtenidos con la biblioteca pVIII-9CaaC son similares a la secuencia consenso SKFDR identificada en el sitio de reconocimiento del AcM CB-EGF1 con la biblioteca de péptidos lineales.

Con el empleo del programa de modelación molecular WHATIF [16], se determinó que todas las moléculas de péptidos mimetizan la zona de interacción del EGF con la cadena beta del REGF. Estas secuencias se caracterizan por la presencia de un residuo aromático (Y/F) cercano a un residuo cargado (K/R).

Los péptidos mas frecuentes obtenidos con ambas bibliotecas (F22-54: CPPAKFSPSVC y F22-55: AKFNDYWRW) fueron sintetizados y evaluados en un ensayo de unión directa de tipo ELISA. Los resultados que se muestran en la figura 3 evidencian un bajo nivel de reconocimiento de ambos péptidos por el AcM CB-EGF1. Generalmente es muy difícil acoplar péptidos directamente a superficies inmuno-

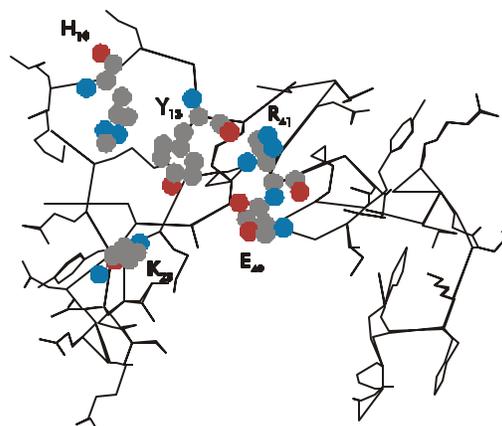


Figura 1. Sitio de reconocimiento del AcM CB-EGF1 según el modelo obtenido a partir de los datos de cristalografía del EGF con el programa Web lab viewer life [16]. Los aa son representados con el código de una letra.

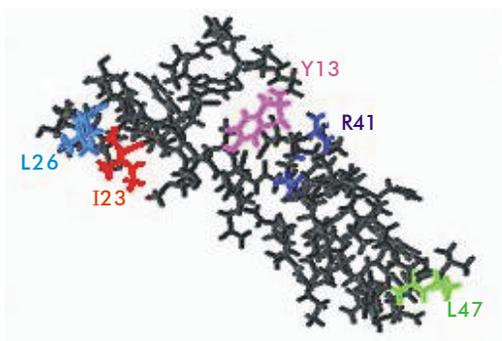


Figura 2. Sitio de reconocimiento del REGF en el modelo de la estructura del EGF. Se señalan los aminoácidos que intervienen en la unión al receptor del EGF.

14. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci (USA) 1977; 74:5463-67.

15. Cortese R, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Galfre G, Pessi A, Tramontano A, Sollazzo M. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. Curr Opin Biotechnol 1995;6:73-80.

16. Vriend, G. WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. J Mol Graph 1990;8:52-6.

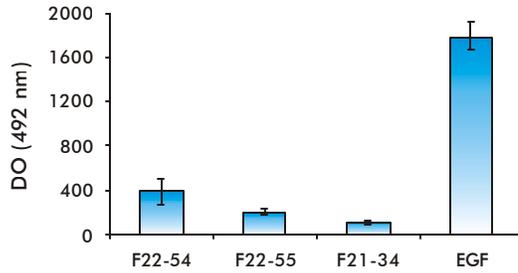


Figura 3. Reconocimiento de los péptidos F22-54 y F22-55 por el AcM CB-EGF1. Se emplearon los controles positivo y negativo EGF y F21-34, respectivamente.

reactivas, tal vez debido al tamaño de estas moléculas [17]. El pretratamiento de las placas con glutaraldehído asegura la unión de los péptidos, pero este reactivo es susceptible a formar complejos multiméricos que no son bien definidos por el anticuerpo [18], y a reaccionar con aminoácidos como K/R y Y/F, que son críticos para la unión del AcM. A pesar de que la diferencia entre las muestras de péptidos positivas y el control negativo empleado es pequeña, las réplicas oscilaron en intervalos bien definidos, lo cual indica que esta variación se debe a la ocurrencia de la reacción y no a la variabilidad entre muestras.

Para comprobar estos resultados y evaluar la inhibición de la unión entre el EGF y el AcM CB-EGF1, ambos péptidos se ensayaron en un ELISA de competencia. Los péptidos fueron preincubados con el AcM CB-EGF1, antes de ser añadidos a placas de poliestireno recubiertas con EGF. Los resultados del ensayo de competencia, que aparecen en la figura 4, muestran que existe el 45 y el 30% de inhibición de la unión del AcM al EGF para los péptidos F22-54 y F22-55, respectivamente. Esta diferencia es significativa para el caso del péptido F22-54, según la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Los resultados observados para ambos péptidos pueden deberse a las diferencias en la secuencia y en la adopción de diferentes conformaciones que serán reconocidas por el AcM. La presencia de varias especies de péptidos podría explicar las diferencias en los experimentos de inhibición de la unión EGF-CB-EGF1.

Con vistas a analizar el posible efecto de los péptidos F22-54 y F22-55 sobre el sistema EGF-REFG, las células 3T3 A31 (ECACC), dependientes del EGF para su proliferación, se reprodujeron a razón de 15 000 células/pozo. Una vez alcanzado el crecimiento deseado, se añadió una concentración de EGF correspondiente a 1.88 UI/mL, y cuatro diluciones seriadas 1:2 de las muestras de péptidos (100  $\mu$ g-12.5  $\mu$ g). Los péptidos se ensayaron en presencia y ausencia de EGF. Luego de 24 horas de incubación, se obtuvieron los valores de DO a 578 nm. Los resultados se muestran en la figura 5. Como control negativo del ensayo se utilizaron células con un medio de crecimiento.

Los resultados indican que ninguno de los péptidos presenta actividad sobre el sistema EGF-REFG. Los valores obtenidos en presencia y ausencia de EGF son similares a los controles empleados en el experimento. Según los datos obtenidos a partir del WHATIF, los péptidos pueden unirse a la cadena beta del REFG. Sin

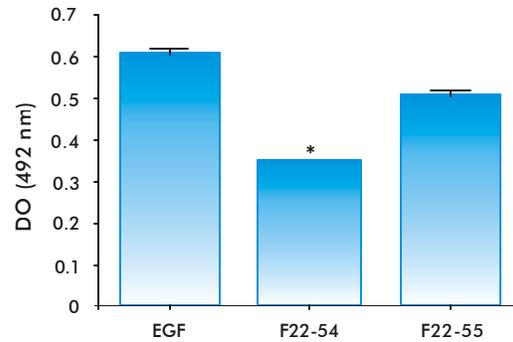


Figura 4. Inhibición de la unión entre EGF y CB-EGF1 por los péptidos F22-54 y F22-55. \* $p < 0.05$  contra el EGF (prueba de comparaciones múltiples de Duncan).

embargo, estos no tienen contacto con la cadena alfa, por lo que al interactuar péptido-REFG no ocurren las modificaciones conformacionales que al interactuar las moléculas de EGF-REFG, las cuales provocan un acercamiento de los dominios I y III del REFG, con la consecuente activación del receptor [19].

Se conoce que los péptidos identificados durante los procesos de selección con el empleo de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos, muestran menos potencia cuando se sintetizan como compuestos individuales [20, 21]. Las razones fundamentales para este comportamiento son: a) Estas pequeñas moléculas no tienen la suficiente estabilidad conformacional como para mantener una unión fuerte a la molécula blanco. En el contexto de los fagos dicha estabilidad está dada por la proteína de la cápsida a la que se encuentran fusionados. b) Las partículas de fagos presentan múltiples copias de la proteína de fusión, y esta multivalencia provoca una elevada avidéz comparada con los péptidos sintéticos.

Una posible estrategia para incrementar la unión de los compuestos sintéticos es lograr esta multivalencia mediante la conjugación de múltiples copias a estructuras más rígidas, como proteínas, liposomas, polímeros, etc. [22-24].

Una vez más la tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos demuestra su valor en la selección de moléculas con capacidad de unión a un blanco determinado. Los péptidos seleccionados pueden emplearse como reactivos para estudiar los mecanismos de reconocimiento molecular, moléculas miméticas para los receptores o servir de base para el diseño de compuestos con potencial terapéutico o diagnóstico.

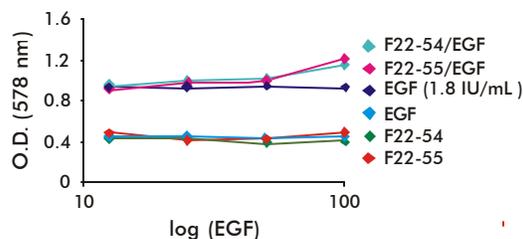


Figura 5. Comportamiento de los péptidos F22-54 y F22-55 en el ensayo de proliferación celular en presencia y ausencia de medio.

17. Byun CH, Park JY, Akamizu T, Chae CB. Identification of the peptides that inhibit the function of human monoclonal thyroid-stimulating antibodies from phage-displayed peptide library. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3311-8.

18. Ball JM, Henry NL, Montelaro RC, Newman MJ. A versatile synthetic peptide-based ELISA for identifying antibody epitopes. *J Immunol Methods* 1994; 171:37-44.

19. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002;110: 775-87.

20. Fuchs S, Kasher R, Balass M, Scherf T, Harel M, Fridkin M, Sussman JL, Katchalski-Katzir E. The binding site of acetylcholine receptor: from synthetic peptides to solution and crystal structure. *Ann NY Acad Sci* 2003;998:93-100.

21. Huang C, Liu XY, Rehemtulla A, Lawrence TS. Identification of peptides that bind to irradiated pancreatic tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62: 1497-503.

22. Mukai Y, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Phage display and PEGylation of therapeutic proteins. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005;8:145-52.

23. Li S, Roberts RW. A novel strategy for *in vitro* selection of peptide-drug conjugates. *Chem Biol* 2003;10:233-9.

24. Lee H, Park TG. A novel method for identifying PEGylation sites of protein using biotinylated PEG derivatives. *J Pharm Sci* 2003;92:97-103.