



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 454**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 27/16** (2006.01)

**A61P 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06019172 .3**

96 Fecha de presentación : **09.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1776958**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2007**

54

Título: **Péptidos con permeabilidad celular inhibidores de la ruta de transducción de señales de la JNK.**

30

Prioridad: **07.06.2002 US 165250**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.05.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.05.2009**

73

Titular/es: **Xigen S.A.**  
**rue des Terreaux 17 (4ème étage)**  
**1003 Lausanne, CH**

72

Inventor/es: **Bonny, Christophe**

74

Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 319 454 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos con permeabilidad celular inhibidores de la ruta de transducción de señales de la JNK.

5 **Campo de la invención**

En general, esta invención se refiere a inhibidores de la proteína-quinasa y, de forma más específica, a inhibidores de la proteína-quinasa c-Jun amino terminal quinasa.

10 **Antecedentes de la invención**

La quinasa c-Jun amino terminal (JNK) es un miembro del grupo activado por estrés de las proteínas quinasas mitogeno-activadas (MAP). Estas quinasas están implicadas en el control del crecimiento y de la diferenciación celular, y, en general, en la respuesta de las células a los estímulos ambientales. La ruta de transducción de señales de la JNK es  
15 activada en respuesta al estrés ambiental y mediante varios tipos de receptores de la superficie celular. Estos receptores pueden incluir los receptores de citoquinas, receptores de serpentina y receptor de la tirosina-quinasa. En las células de mamíferos, la JNK está involucrada en procesos biológicos tales como la transformación oncogénica y en la mediación de respuestas adaptativas al estrés ambiental. La JNK se ha asociado también a la modulación de las respuestas inmunes, incluidas la maduración y diferenciación de las células inmunes, así como a la muerte celular programada en células  
20 identificadas como para ser destruidas por el sistema inmune.

Diversas publicaciones se refieren a la JNK y a la ruta de transducción de señales de la JNK. Por ejemplo, la WO 98/49188 describe inhibidores de la ruta de transducción de señales de la JNK, así como métodos para su utilización. En particular, la WO 98/49188 identifica la proteína 1 interactuando con JNK (JIP-1), un inhibidor de la proteína  
25 JNK1. Además, revela métodos generales para tratar un estado patológico o métodos para prevenir la aparición de un estado patológico en un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptidos JIP-1. La WO 98/49188 no describe la utilización de péptidos que contienen péptidos específicos IB1 (JIP-1) o IB2 y que adicionalmente contienen secuencias TAT como moléculas transportadoras para el tratamiento de la pérdida de audición.

De forma similar, la WO 01/27268 revela inhibidores peptídicos con permeabilidad celular de la ruta de transduc-  
30 ción de señales de la JNK, que se unen a las proteínas JNK e inhiben los efectos mediados por JNK en las células expresas de JNK. La WO 01/27268 no describe el tratamiento de la pérdida de audición. De forma más particular, la WO 01/27268 no revela la utilización de péptidos que contienen los péptidos específicos IB1 o IB2 y que contienen adicionalmente secuencias TAT como moléculas transportadoras para el tratamiento de la pérdida de audición.  
35

Bonny y col. (Diabetes, Vol. 50, enero 2001) describen secuencias peptídicas relacionadas con JNKI-1. Sin embar-  
40 go, en Bonny y col. (2001) se relacionan exclusivamente con la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas inducida por IL-1 $\beta$  y no menciona la pérdida de audición o enfermedad alguna relacionada con la misma.

De forma similar, la WO 98/44106 muestra el IB-1 y la utilización de polipéptidos relacionados con IB-1 para el  
tratamiento de diversas enfermedades. La WO 98/44106 no especifica el uso de las secuencias específicas de IB1 o  
IB2 de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de la pérdida de audición.

Vivès y col. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 25, Publicación de 20 de junio, pp. 16010-16017,  
1997), WO 94/04686, Bonny y col. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 4, Publicación de 23 de enero,  
pp. 1843-1846, 1998) y Lee y col. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278, No. 5, Publicación de 23 de enero,  
pp. 2896-2902, 2003) tratan también de las proteínas relacionadas con IB1 o JNK. Sin embargo, ninguno de estos  
45 documentos describe el tratamiento de la pérdida de audición o incluso la utilización de péptidos que contienen los  
péptidos específicos IB1 o IB2 y contienen adicionalmente secuencias TAT como moléculas transportadoras para el  
tratamiento de la pérdida de audición.  
50

**Sumario de la invención**

55 La presente invención se base en parte en el descubrimiento de péptidos que son inhibidores eficaces de las proteí-  
nas JNK. Los péptidos mencionados aquí como inhibidores peptídicos de JNK disminuyen los efectos proliferativos  
en las células "aguas abajo" de la quinasa c-Jun amino terminal (JNK).

En consecuencia, la invención incluye la utilización de nuevos péptidos inhibidores de JNK ("péptidos JNKI")  
60 incluyendo cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre las SEQ ID NOs: 3-6 y 22, así como  
péptidos quiméricos, seleccionándose cualquiera de las secuencias de aminoácidos de entre las SEQ ID NOs: 11-16  
y 23-26, que incluyen un inhibidor peptídico de JNK ligado a un péptido de tráfico que se puede utilizar para dirigir  
un péptido en el que está presente hacia un lugar celular deseado, o la utilización de ácidos nucleicos que codifican  
estos péptidos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un  
65 sujeto, caracterizada porque el péptido impide que se dañen los estereocilios de las células pilosas, la apoptosis de las  
células pilosas o la apoptosis neuronal. La secuencia de tráfico se puede utilizar para dirigir el transporte del péptido a  
través de la membrana plasmática. Alternativa o adicionalmente, el péptido de tráfico se puede utilizar para dirigir el  
péptido hacia un lugar intracelular, tal como el núcleo.

Los péptidos inhibidores de JNK pueden estar presentes como polímeros de L-aminoácidos. Alternativamente, los péptidos pueden estar presentes como polímeros de D-aminoácidos.

La pérdida de audición puede ser un trauma acústico. Así, en un aspecto, el péptido debe ser administrado antes de que el sujeto esté expuesto a un trauma acústico. En otro aspecto, el péptido debe administrarse después de que el sujeto ha sido expuesto a un trauma acústico. El trauma acústico puede ser, por ejemplo, de al menos 90 dB SPL. Alternativamente, la pérdida de audición está provocada por un tratamiento con antibióticos. Así, en un aspecto, el péptido debe administrarse antes de que el sujeto esté expuesto a un antibiótico. En otro aspecto, el péptido debe administrarse después de que el sujeto ha estado expuesto a un antibiótico. El antibiótico es, por ejemplo, un aminoglicósido.

La pérdida de audición puede ser causada por un agente quimioterapéutico. Así, en un aspecto, el péptido debe administrarse antes de que el sujeto esté expuesto a un agente quimioterapéutico. En otro aspecto, el péptido debe administrarse después de que el sujeto ha estado expuesto a un agente quimioterapéutico.

La administración de los péptidos de la invención puede realizarse mediante cualquier vía de administración seleccionada de entre la administración intraauricular, intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral y en parche.

Entre las ventajas proporcionadas por la invención, una de ellas consiste en que los péptidos inhibidores de JNK utilizados aquí son pequeños y se pueden producir fácilmente en cantidades masivas y con una gran pureza. Los péptidos inhibidores son también resistentes a la degradación intracelular y son escasamente inmunogénicos. En consecuencia, los péptidos se adaptan bien a aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en las cuales se desea la inhibición de la expresión de JNK.

Salvo definido de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o pruebas de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, regirá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención se evidenciarán a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1A-C: diagramas que muestran alineaciones de regiones de dominios conservados de JBD en los factores de transcripción indicados.

Fig. 2: diagrama que muestra alineaciones de péptidos de fusión TAT-IB genéricos.

Fig. 3: histograma que describe la inhibición de la muerte de células- $\beta$  por un dominio JBD de el mínimo de 23 aminoácidos de longitud de IB1 en comparación con el dominio de JBD completo de 280 aminoácidos.

Fig. 4: es una ilustración que demuestra los efectos de los péptidos TAT, TAT-IB1 y TAT-IB2 sobre la fosforilación de las JNKs recombinantes. El panel A muestra la inhibición de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 por las JNKs recombinantes *in vitro*. El panel B muestra experimentos dosis-respuesta similares al Panel A.

Fig. 5: histograma que describe la inhibición de la fosforilación de L-TAT-IB por JNKs recombinantes. El panel A muestra la inhibición de L-TAT-IB de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 por las JNKs recombinantes *in vitro* en presencia de MKK4. El panel B muestra experimentos dosis-respuesta similares con MKK7.

Fig. 6: es una ilustración que demuestra la inhibición de la fosforilación de c-Jun por JNKs activadas.

Fig. 7: histograma que describe la inhibición a corto plazo de la muerte de células- $\beta$  pancreáticas inducidas por IL-1 $\beta$  por los péptidos L-TAT-IB.

Fig. 8: histograma que describe la inhibición a corto plazo de la muerte de células- $\beta$  pancreáticas inducidas por IL-1 $\beta$  por los péptidos D-TAT-IB.

Fig. 9: histograma que describe la inhibición a largo plazo o la muerte de células- $\beta$  pancreáticas inducidas por IL-1 $\beta$  por los péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1.

Fig. 10: histograma que describe la inhibición de la muerte de las células WiDr de cáncer de colón humano inducida por irradiación por los péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1.

Fig. 11: es una ilustración de la modulación de la actividad de la quinasa JNK por los péptidos L-TAT, TAT-IB1 y D-TAT-IB1.

## ES 2 319 454 T3

Fig. 12: gráficos que describen los efectos protectores de los péptidos TAT-IB1 en ratones. El panel A muestra el efecto de la irradiación sobre el peso. El panel B muestra el efecto de la irradiación sobre un estado de edema y eritema.

5 Fig. 13: describe el efecto protector de D-JNK1 sobre la pérdida de audición inducida por ruido. El panel A muestra una descripción esquemática del experimento, el panel B muestra un gráfico de la pérdida de audición, los paneles C y D describen un examen histológico de un oído contralateral (control) e inyectado con D-JNK1 respectivamente.

Fig. 14A y B: describen el efecto protector de D-JNK1 sobre la pérdida de audición inducida por antibióticos.

10 Fig. 15: gráfico de barras que describe un aumento de la recuperación de los islotes pancreáticos sometidos al tratamiento con D-JNK1 durante el procedimiento de aislamiento.

15 Fig. 16A: ilustración que demuestra la sensibilidad y especificidad de los péptidos inhibidores de la JNK (JNKI) de la presente invención con respecto a la activación y acción de la JNK. La Fig. 16A demuestra el efecto inhibitor de L-JNKI1 y D-JNKI1 sobre la activación y acción de JNK en ensayos de quinasa respectivamente con JNK1 $\alpha$ 1 y sustratos de GST-Jun y GST-Elk1.

20 Fig. 16B: ilustración que demuestra la sensibilidad y especificidad de los péptidos inhibidores de la JNK (JNKI) de la presente invención con respecto a la activación y acción de la JNK. La Fig. 16B demuestra el efecto inhibitor de la secuencia inhibidora mínima de JNK de 20 aminoácidos de JIP-IB1 (forma-L de JBD<sub>20</sub>) en experimentos dosis-respuesta utilizando condiciones similares a las de la Fig. 16A y con cantidades decrecientes de L-JBD<sub>20</sub>.

25 Fig. 16C: ilustración que demuestra la sensibilidad y especificidad de los péptidos inhibidores de la JNK (JNKI) de la presente invención con respecto a la activación y la acción de la JNK. La Fig. 16C demuestra la especificidad de los péptidos JNKI de la presente invención en el bloqueo de la activación de JNK por medio de ensayos de quinasa con distintas quinasas recombinantes.

30 Fig. 17A: ilustración que demuestra la activación de JNK inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) en neuronas no tratadas (0) y en neuronas expuestas a NMDA 100  $\mu$ M durante 10 minutos (10') o durante 30 minutos (30').

35 Fig. 17B: ilustración que demuestra los efectos de los péptidos JNKI de la presente invención a nivel de la fosforilación de c-Jun y la cantidad de JNK después de su exposición a NMDA. En la Fig. 17B, se cargó 4 veces más proteína en los extractos nucleares (Nucl) que en los citoplásmicos (Cyt), las abreviaturas empleadas son: C: Control; N: NMDA; L: L-JNKI1 + NMDA; D: D-JNKI1 + NMDA.

Fig. 17C: histograma que describe la cuantificación de la expresión de c-fos por PCR en tiempo real utilizando ARN extraído. La Fig. 17C ilustra la expresión de c-fos relativa a la actina.

40 Fig. 18: ilustraciones y un histograma que describen el período de neurotoxicidad y neuroprotección de NMDA por L-JNKI1, D-JNKI1 y dos péptidos de control, TAT-vacío (la secuencia de TAT sola, sin JBD<sub>20</sub>) y L-JNKI1-mut (donde 6 aminoácidos han sido mutados a alanina).

45 Fig. 18A-18E: una serie de micrográficos que describen neuronas teñidas con Hoechst 24 horas después del tratamiento con NMDA.

Fig. 18F: histograma que describe la muerte neuronal 12, 24 y 48 horas después de su exposición a NMDA (100  $\mu$ M NMDA) tal como lo indica la actividad de LDH.

Fig. 19: ilustraciones y un histograma que describen la isquemia transitoria en ratones.

50 Fig. 19A: demuestra el efecto sobre el volumen infartado de un pretratamiento en el cual se administró una inyección intracerebroventricular (icv) de D-JNKI1 (15,7 ng en 2  $\mu$ l de solución de tampón fosfato (PBS)) a un sujeto 1 hora antes de la oclusión.

55 Fig. 19B: demuestra el efecto sobre el volumen infartado cuando la inyección icv de D-JNKI1 se administra 1 hora antes de la oclusión o 3, 6 y 12 horas después de la oclusión.

Fig. 20: ilustraciones y un histograma que demuestran la protección por D-JNKI1 contra la isquemia focal permanente en ratas jóvenes (P14) que habían sido sometidas a perfusión 24 horas después de la oclusión.

60 Fig. 20A: una serie de ilustraciones que describe ejemplos de lesiones en una rata control (panel de la izquierda) y una rata tratada con D-JNKI1 6 horas después de la oclusión (panel de la derecha).

65 Fig. 20B: histograma que describe los volúmenes infartado, expresados en % de volumen hemisférico, después de la inyección intraperitoneal (i.p.) de D-JNKI1 -0,5 hora antes o +6 ó +12 horas después de la oclusión.

Fig. 20C: una serie de ilustraciones que describe los resultados de la inmunohistoquímica para una P-c-Jun en la que se fosforiló c-Jun en numerosas neuronas en la corteza peri-infartada.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención en parte se basa en el descubrimiento de péptidos con permeabilidad celular que inhiben la ruta de señales de la quinasa c-Jun amino terminal (JNK) activada. Estos péptidos se denominan aquí péptidos inhibidores de la JNK.

Los péptidos inhibidores de la JNK fueron identificados mediante la inspección de alineaciones de secuencias entre los Dominios de Unión de kJNK en diversas proteínas de unión a insulina (IB). Los resultados de esta alineación se muestran en las Figs. 1A-1C. La Fig. 1A describe la región de más alta homología entre los JBDs de IB1, IB2, c-Jun y ATF2. El panel B describe la alineación de secuencias de aminoácidos de los JBDs de IB1 e IB2. Los residuos totalmente conservados se indican mediante asteriscos, mientras que los residuos cambiados a Ala en el vector GFP-JBD<sub>23Mut</sub> se indican mediante círculos en blanco. La Fig. 1C muestra las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas que incluyen un dominio de péptidos inhibidor de la JNK y un dominio de tráfico. En el ejemplo mostrado, el dominio de tráfico procede del polipéptido TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el péptido inhibidor de la JNK procede de un polipéptido IB1. Las secuencias de humanos, ratón y rata son idénticas en los Paneles B y C.

La comparación de las secuencias entre los dominios de unión de JNK de IB1 [SEQ ID NO:17], IB2 [SEQ ID NO:18], c-Jun [SEQ ID NO:19] y ATF2 [SEQ ID NO:20] revelaron una secuencia de 8 aminoácidos parcialmente conservados (Fig. 1A). Una comparación de los JBDs de IB1 e IB2 reveló además dos bloques de siete y tres aminoácidos que están altamente conservados entre las dos secuencias. Estos dos bloques están contenidos en una secuencia peptídica de 23 aminoácidos en IB1 [SEQ ID NO:1] y 21 aminoácidos en IB2 [SEQ ID NO:2]. La secuencia inhibidora mínima de JNK de 20 aminoácidos de JIP-IB1 (forma-L de JBD<sub>20</sub> (SEQ ID NO:21)) se muestra en la Fig. 1C.

Los péptidos inhibidores de la JNK tal como se mencionan anteriormente se pueden utilizar en aplicaciones *in vitro*, *ex vivo* y son adecuados para aplicaciones *in vivo*. Como las JNKs y todas sus isoformas participan en el desarrollo y establecimiento de estados patológicos tales como la pérdida de audición o en rutas, los péptidos de JNK, incluyendo cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre las SEQ ID NOS. 3-6 y 22, o seleccionándose cualquiera de las secuencias de aminoácidos entre las SEQ ID NOS: 11-16 y 23-26, se pueden utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un sujeto.

Se presentan en la Tabla 1 los péptidos inhibidores de la JNK revelados aquí. La tabla presenta el nombre del péptido inhibidor de la JNK, así como su número identificador de secuencia, su longitud y su secuencia de aminoácidos.

TABLA 1

<b>Péptido, nombre</b>	<b>SEQ ID</b>	<b>AA</b>	<b>Secuencia</b>
L-IB1	1	23	DTYRPKRPTT LNLFPQVPRS QDT
L-IB2	2	21	EEPHKHRPTT LRLTTLGAQD S
D-IB1	3	23	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTD
D-IB2	4	21	SDQAGLTTR LTTPRHKHPE E
L-IB (genérico)	5	19	XRPTTLXLXX XXXXXQDS/TX
D-IB (genérico)	6	19	XS/TDQXXXXXX XLXLTPRX
L-TAT	7	10	GRKKRRQRRR
D-TAT	8	10	RRRQRRKKRG
L-genérico-TAT	9	17	XXXXRKKRRQ RRRXXXX

ES 2 319 454 T3

	D-genérico-TAT	10	17	XXXXRRRQRR KKRXXXX
5	L-TAT-IB1	11	35	GRKKRRQRRR PPDYRPKRP TTLNLFQVP RSQDT
10	L-TAT-IB2	12	33	GRKKRRQRRR PPEEPHKHRP TTLRLTTLGA QDS
15	L-TAT-IB (genérico)	13	42	XXXXXXXXRKK RRQRRRXXXX XXXXRPTTLX LXXXXXXXXQD S/TX
20	D-TAT-IB1	14	35	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YDPPRRRQR RKKRG
25	D-TAT-B2	15	33	SDQAGLTTLR LTPRHKHPE EPPRRRQRRK KRG
30	D-TAT-IB (genérico)	16	42	XT/SDQXXXXXX XLXLTTPRXX XXXXXRRRQ RRKKRXXXXX XX
35	IB1-largo	17	29	PGTGCGDTYR PKRPTTLNLF PQVPRSQDT
40	IB2-largo	18	27	IPSPSVEEPH KHRPTTLRLT TLGAQDS
	c-Jun	19	29	GAYGYSNPKI LKQSMTLNLA DPVGNLKP
45	ATF2	20	29	TNEDHLAVHK HKHBMTLKFG PARNSVIV
	L-JBD <sub>20</sub>	21	20	RPKRPTTLNL FPQVPRSQDT
50	D-JBD <sub>20</sub>	22	20	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR
55	L-TAT-JNK11 (es decir, L-TAT- JBD <sub>20</sub> )	23	32	GRKKRRQRRR PPRPKRPTTL NLFQVPRSQ DT
60	D-TAT-JNK11 (es decir, D- TAT-JBD <sub>20</sub> )	24	32	TDQSRPVQPF LNLTPRRPR PPRRRQR RKKRG
65				

5	L-TAT-JNKI1 (genérico)	25	34	XXXXRKKRRQ RRRXXXXRPT TLXLXXXXXX XQDS/T
10	D-TAT-JNKI1 (genérico)	26	34	S/TDQXXXXXXXX LXLTPRXXX XRRRQRRKKR XXXX
15	L-JBD <sub>20</sub> -mut	27	20	RPKRPTAANA FPQVPRSQDT
	D-JBD <sub>20</sub> -mut	28	20	TDQSRPVAPF ANAATPRKPR

### 20 Péptidos inhibidores de JNK

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un péptido inhibidor de la JNK que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre las SEQ ID NOs: 3-6 y 22, o un péptido que es al menos en un 5% homólogo a estos péptidos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un sujeto, caracterizado porque el péptido impide que se dañen los estereocilios de las células pilosas, la apoptosis de las células pilosas o la apoptosis neuronal. No se presupone por el término "péptido" ninguna longitud particular. En algunas realizaciones, el péptido inhibidor de JNK es inferior a 280 aminoácidos de longitud, por ejemplo, inferior o igual a 150, 100, 75, 50, 35 ó 25 aminoácidos de longitud. En varias realizaciones, el péptido inhibidor de unión a JNK incluye la secuencia de aminoácidos de una o más de las SEQ ID NOs: 3 y 22. En una realización, los péptidos inhibidores de la JNK se pueden unir a JNK. En otra realización, los péptidos pueden inhibir la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun, ATF2 o Elk1.

Ejemplos de péptidos inhibidores de JNK incluyen un péptido que comprende (en su totalidad o en parte) la secuencia NH<sub>2</sub>-DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH [SEQ ID NO:1]. En otra realización, el péptido incluye la secuencia NH<sub>2</sub>-EPEPKHRPTTLRLTLGAQDS-COOH [SEQ ID NO:2]. Alternativamente, ejemplos de péptidos inhibidores de JNK comprenden un péptido que incluye (en su totalidad o en parte) la secuencia NH<sub>2</sub>-RPKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH [SEQ ID NO:21].

Los péptidos inhibidores de JNK pueden ser polímeros de L-aminoácidos, de D-aminoácidos o una combinación de ambos. Si los péptidos inhibidores de JNK son D-aminoácidos, los péptidos son péptidos retro-inversos D. El término "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia está invertida, el término "isómero D-retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo aminoácido está invertida. Véase, por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693 (1994). El resultado neto de combinar los enantiómeros D y la síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino de cada enlace amida se intercambian, mientras que la posición de los grupos de la cadena lateral en cada carbono alfa se conserva. Salvo que se estipule específicamente de otro modo, se supone que toda secuencia dada de L-aminoácidos de la invención se puede convertir en un péptido retro-inverso D mediante la síntesis de un reverso de la secuencia para la secuencia nativa de L-aminoácidos correspondiente.

Por ejemplo, un péptido retro-inverso D tiene la secuencia NH<sub>2</sub>-TDQSRPVQPFNLNLTTPRKPRYT-COOH [SEQ ID NO:3] ó NH<sub>2</sub>-SDQAGLTILRLTTPRHKHPEE-COOH [SEQ ID NO:4]. Alternativamente, un péptido retro-inverso D incluye la secuencia NH<sub>2</sub>-TDQSRPVQPFNLNLTTPRKPR-COOH [SBQ ID NO:22]. Se ha descubierto inesperadamente que los péptidos retro-inversos D tienen múltiples propiedades útiles. Por ejemplo, los péptidos D-TAT y D-TAT-IB, así como D-TAT-JNKI, penetran en las células tan eficazmente como los péptidos L-TAT y L-TAT-IB así como D-TAT-JNKI, y los péptidos D-TAT y D-TAT-IB, así como D-TAT-JNKI, son más estables que los L-péptidos correspondientes. Además, mientras los D-TAT-IB1 son ~ 10-20 veces menos eficaces en la inhibición de JNK que los L-TAT-IB y L-TAT-JNKI, son ~ 50 veces más estables *in vivo*. Además, los péptidos JNKI D-retro-inversos son resistentes a las proteasas. Finalmente, tal como se expone más adelante, los péptidos D TAT-IB y D-TAT-JNKI protegen las células irradiadas ionizantes y tratadas con interleuquina-1 contra la apoptosis, y estos péptidos son útiles en el tratamiento de las neuronas, ya que la secuencia TAT contiene seis pares de aminoácidos que convierten la secuencia TAT en extremadamente sensible a las proteasas neuronales, implicadas en el procesamiento de péptidos en el sistema nervioso. Véase por ejemplo, Steiner y col., J. Biol. Chem. 267:23435-23438 (1992); Brugidou y col., Biochem. & Biophys. Res. Comm. 214:685-693 (1995).

Un péptido inhibidor de JNK tal como se utiliza de acuerdo con la invención incluye la secuencia de aminoácidos NH<sub>2</sub>-X<sub>n</sub>-RPTTLXLXXXXXXXXXQDS/T-X<sub>n</sub>-COOH [SEQ ID NO:5, y los residuos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID NO:13, tal como se muestra en la Fig. 2. Tal como se utiliza aquí, X<sub>n</sub> puede ser de cero residuos de longitud o puede ser una

## ES 2 319 454 T3

extensión contigua de residuos de péptidos derivados de las SEQ ID NOs:1 y 21, preferentemente una extensión de entre 1 y 7 aminoácidos de longitud, o puede ser de 10, 20, 30 o más aminoácidos de longitud. El único residuo representado por S/T puede ser Ser o Thr en la secuencia genérica. En otra realización, el péptido inhibidor de JNK tal como se utiliza aquí puede ser un péptido retro-inverso D que tiene la secuencia NH<sub>2</sub>-X<sub>n</sub>-S/TDQXXXXXXXXLXLTPR-X<sub>n</sub>-COOH [SEQ ID NO:6], y los residuos 17-42 de L-TAT-IB, [SEQ ID NO:16, tal como se muestra en la Fig. 2.

Los péptidos inhibidores de JNK se pueden obtener o producir por medio de métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por síntesis química, métodos de ingeniería genética tal como se expone a continuación. Por ejemplo, un péptido que corresponde a una parte de un péptido inhibidor de JNK incluyendo una región o dominio deseado, o que media la actividad deseada *in vitro*, se puede sintetizar utilizando un sintetizador peptídico.

Un péptido inhibidor de JNK candidato puede analizarse mediante un análisis de hidrofiliidad (véase por ejemplo, Hopp y Woods, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78:3824-3828), que se puede utilizar para identificar las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de los péptidos, ayudando así en el diseño de los sustratos para la manipulación experimental, tal como en los experimentos de unión, síntesis de anticuerpos. Se puede realizar también un análisis estructural secundario para identificar las regiones de un péptido inhibidor de JNK que asumen motivos estructurales específicos. Véase por ejemplo, Chou y Fasman, 1974. Biochem 13:222-223. La manipulación, traducción, predicción de estructura secundaria, perfiles de hidrofiliidad e hidrofobicidad, predicción y representación del marco abierto de lectura, así como la determinación de las homologías de secuencia se pueden llevar a cabo utilizando programas de software informático disponibles en la técnica. Se pueden emplear también otros métodos de análisis estructural, incluyendo, por ejemplo, la cristalografía de rayos X (véase por ejemplo, Engstrom, 1974. Biochem Exp Biol 11:7-13); la espectroscopía de masas y la cromatografía de gases (véase, por ejemplo, METHODS IN PROTEIN SCIENCE, 1997, J. Wiley and Sons, New York, NY) y la modelación por ordenador (véase, por ejemplo, Fletterick y Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, In: CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

La presente invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican los péptidos de unión a JNK de la invención que tienen la forma de aminoácidos L, por ejemplo aquellos péptidos L indicados en la Tabla 1, así como los complementos de estas secuencias. Las fuentes apropiadas de ácidos nucleicos que codifican péptidos inhibidores de JNK incluyen el ácido nucleico IB1 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponibles con los Nos. de Acceso al GenBank AF074091 y AAD20443, respectivamente. Otras fuentes incluyen ácido nucleico IB1 de rata y se muestran secuencias de proteínas con los Nos. de Acceso al GenBank AF108959 y AAD22543 respectivamente. El ácido nucleico IB2 humano así como las secuencias de proteínas se muestran con el N°. de Acceso al GenBank AF218778.

Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos inhibidores de JNK se pueden obtener mediante cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, por amplificación PCR utilizando cebadores sintéticos hibridizables a los extremos 3' y 5' de la secuencia y/o mediante clonación a partir de un cADN o de una librería genómica utilizando una secuencia de oligonucleótidos específica para la secuencia genética dada).

Para la expresión recombinante de uno o más péptidos inhibidores de JNK, el ácido nucleico que contiene la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido se puede insertar en un vector de expresión apropiado (es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica el péptido insertado). Los elementos reguladores pueden ser heterólogos (es decir, no el promotor genético nativo). Alternativamente, las señales transcripcionales y de traducción necesarias pueden ser suministradas también por el promotor nativo para los genes y/o sus regiones flanqueantes.

Se pueden utilizar diversos sistemas huésped-vector para expresar la(s) secuencia(s) de codificación del péptido. Éstos incluyen, pero no se limitan a: (i) sistemas celulares de mamíferos que están infectados por el virus *vaccinia*, adenovirus y similares; (ii) sistemas celulares de insectos infectados por baculovirus y similares; (iii) levaduras que contienen vectores de levadura o (iv) bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN de plásmidos o ADN de cósmidos. Según el sistema huésped-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de diversos elementos adecuados de transcripción y traducción.

Las secuencias promotoras/intensificadoras dentro de los vectores de expresión pueden utilizar secuencias reguladoras de plantas, animales, insectos u hongos, tal como se define en la invención. Por ejemplo, los elementos promotores/intensificadores se pueden utilizar a partir de levaduras y otros hongos (por ejemplo, el promotor GAIA, el promotor de alcohol-deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol-quinasa, el promotor de fosfatasa-alcalina). Alternativa o adicionalmente, pueden incluir regiones de control transcripcional de animales, por ejemplo (i) la región de control del gen de la insulina activa dentro de las células- $\beta$  pancreáticas (véase, por ejemplo, Hanahan y col., 1985. Nature 315: 115-122); (ii) la región de control del gen de la inmunoglobulina activa dentro de las células linfoides (véase, por ejemplo, Grosschedl y col., 1984. Cell 38: 647-658); (iii) la región de control del gen de la albúmina activa dentro del hígado (véase, por ejemplo, Pinckert y col., 1987. Genes and Dev 1: 268-276); (iv) la región de control del gen de la proteína básica de la mielina activa dentro de las células de los oligodendrocitos cerebrales (véase, por ejemplo, Readhead y col., 1987. Cell 48: 703-712); y (v) la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas activa dentro del hipotálamo (véase, por ejemplo, Mason y col., 1986, Science 234: 1372-1378) y similares.



## ES 2 319 454 T3

Los vectores de expresión o sus derivados incluyen, por ejemplo, virus humanos o animales (por ejemplo virus *vaccinia* o adenovirus); virus de insectos (por ejemplo baculovirus); vectores de levadura; vectores bacteriófagos (por ejemplo fago lambda); vectores de plásmidos y vectores de cósmidos.

5 Se puede seleccionar una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias de interés insertadas o que modifique o procese péptidos expresados codificados por las secuencias de la manera específica deseada. Además, la expresión procedente de ciertos promotores puede ser intensificada en presencia de ciertos inductores en una cepa huésped seleccionada, facilitando así el control de la expresión de un péptido construido genéticamente. Además, distintas células huésped poseen mecanismos característicos y específicos para la modificación y el procesamiento traduccional y post-traduccional (por ejemplo glicosilación, fosforilación y similares) de los péptidos expresados. Por tanto, se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar que se obtiene la modificación y el procesamiento deseados del péptido extraño. Por ejemplo, la expresión del péptido dentro de un sistema bacteriano se puede utilizar para producir un péptido de núcleo no glicosilado, mientras que la expresión dentro de las células de mamíferos asegura la glicosilación “nativa” de un péptido heterólogo.

15 Se describen también aquí derivados, fragmentos, homólogos, análogos y variantes de los péptidos inhibidores de JNK de la invención tal como se definen anteriormente, así como los ácidos nucleicos que codifican estos péptidos. Para los ácidos nucleicos, los derivados, fragmentos y análogos proporcionados aquí, se definen como secuencias de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos) y que tienen una longitud suficiente para permitir la hibridación específica. 20 Para los aminoácidos, los derivados, fragmentos y análogos proporcionados aquí se definen como secuencias de al menos 4 aminoácidos (contiguos), con una longitud suficiente para tener en cuenta el reconocimiento específico de un epítipo.

La longitud de los fragmentos es inferior a la longitud del ácido nucleico o del polipéptido de longitud completa correspondiente del que procede el péptido inhibidor de JNK o el ácido nucleico que codifica el mismo. Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o de otra longitud cuando el derivado o análogo contiene un aminoácido o ácido nucleico modificado. Los derivados o análogos de los péptidos inhibidores de JNK incluyen, por ejemplo, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los péptidos, en varias realizaciones, con al menos un 95% aproximadamente, un 98% o incluso un 99% de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se comparan con una secuencia alineada en la que la alineación se lleva a cabo mediante un programa informático por homología conocido en la técnica. Por ejemplo la identidad de secuencia se puede medir utilizando un software de análisis de secuencias (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) con los parámetros por defecto aquí incluidos.

35 En el caso de secuencias de polipéptidos que son idénticas en menos de un 100% a una secuencia de referencia, las posiciones no idénticas son preferentemente, pero no forzosamente, sustituciones conservadoras para la secuencia de referencia. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina y treonina; 40 lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Así, se incluyen en la invención péptidos que tienen secuencias mutadas de modo tal que siguen siendo homólogos, por ejemplo en la secuencia, en la función y en el carácter antigénico, o en otra función, a una proteína que tiene la secuencia original correspondiente. Estas mutaciones pueden ser, por ejemplo, mutaciones que implican cambios de aminoácidos conservativos, por ejemplo cambios entre aminoácidos con propiedades moleculares muy similares. Por ejemplo, los intercambios dentro del grupo alifático alanina, valina, 45 leucina e isoleucina se pueden considerar como conservativos. A veces, la sustitución de glicina por uno de estos se puede considerar también conservativa. Otros intercambios conservativos incluyen aquellos dentro del grupo alifático aspartato y glutamato; dentro del grupo amida asparagina y glutamina; dentro del grupo hidroxilo serina y treonina; dentro del grupo aromático fenilalanina, tirosina y triptófano; dentro del grupo básico lisina, arginina e histidina; y dentro del grupo que contiene azufre metionina y cisteína. A veces la sustitución dentro del grupo metionina y leucina se puede considerar también conservativa. Los grupos de sustitución conservativa preferentes son aspartato-glutamato; 50 asparagina-glutamato; valina-leucina-isoleucina; alanina-valina; fenilalanina-tirosina y lisina-arginina.

Cuando se dice que un polipéptido particular tiene un identidad porcentual específica con respecto a un polipéptido de referencia de una longitud definida, la identidad porcentual tiene relación con el péptido de referencia. Así, un péptido que es idéntico en un 50% a un polipéptido de referencia que tiene una longitud de 100 aminoácidos puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos que es totalmente idéntico a una parte de 50 aminoácidos de longitud del polipéptido de referencia. Puede ser también un polipéptido de 100 aminoácidos de longitud que es idéntico en un 50% al polipéptido de referencia con respecto a su longitud total. Por supuesto, otros polipéptidos cumplirán con los mismos criterios.

60 La invención abarca también las variantes alélicas de los polinucleótidos o péptidos revelados; es decir, las formas alternativas naturales del polinucleótido aislado que codifican también péptidos que son idénticos, homólogos o relacionados con aquel codificado por los polinucleótidos. Alternativamente, se pueden producir variantes no naturales mediante técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

65 La presente invención proporciona también homólogos de especie de los polinucleótidos y péptidos revelados. “Variante” se refiere a un polinucleótido o a un polipéptido que es diferente del polinucleótido o polipéptido de la presente invención, pero que conserva las propiedades esenciales del mismo. En general, las variantes son globalmente

## ES 2 319 454 T3

muy similares y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o al polipéptido de la presente invención. Las variantes pueden contener alteraciones en las regiones de codificación, en las regiones no codificadoras o en ambas.

En algunas realizaciones, las secuencias alteradas incluyen inserciones de tal modo que la secuencia general de aminoácidos se alarga mientras la proteína conserva sus propiedades de tráfico. Además, las secuencias alteradas pueden incluir deleciones internas aleatorias o diseñadas que acortan la secuencia global de aminoácidos mientras que la proteína conserva las propiedades de transporte.

Las secuencias alteradas pueden ser codificadas adicional o alternativamente por los polinucleótidos que se hibridizan bajo condiciones rigurosas con la hebra apropiada del polinucleótido natural que codifica un polipéptido o péptido del que procede el péptido inhibidor de JNK. El péptido variante se puede someter a ensayo en busca de la unión a JNK y de la modulación de la actividad mediada por JNK utilizando los ensayos aquí descritos. Las "condiciones rigurosas" dependen de la secuencia y serán distintas en distintas circunstancias. En general, las condiciones rigurosas se pueden seleccionar para que sean a temperatura inferior en aproximadamente 5°C que el punto de fusión térmico ( $T_M$ ) para la secuencia específica a una intensidad iónica y pH definidos. La  $T_M$  es la temperatura (bajo una intensidad iónica y pH definidos) a la que un 50% de la secuencia diana se hibridiza a una sonda perfectamente coincidente. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal sea de al menos aproximadamente 0,02 molar a un pH de 7 y la temperatura sea al menos aproximadamente 60°C. Como otros factores que pueden afectar a la rigurosidad de la hibridación (incluyendo, entre otros, la composición base y el tamaño de las hebras complementarias), la presencia de disolventes orgánicos y el alcance de desajuste de la base, la combinación de los parámetros es más importante que la medida absoluta de cualquiera de los mismos.

Una alta rigurosidad puede incluir, por ejemplo, el Paso 1: Se pretratan filtros que contienen ADN durante 8 horas a toda la noche a 65°C en un tampón compuesto por 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH de 7,5), 1 mM EDTA, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02% y 500  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Paso 2: Se hibridizan los filtros durante 48 horas a 65°C en la mezcla de prehibridación anterior a la que se añaden 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y  $5-20 \times 10^6$  cpm de sonda  $^{32}\text{P}$ -marcada. Paso 3: Se lavan los filtros durante 1 hora a 37°C en una solución que contiene 2X SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01% y BSA al 0,01%. Seguidamente se lavan con 0,1X SSC a 50°C durante 45 minutos. Paso 4: Se autorradiografían los filtros. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de alta rigurosidad que se pueden utilizar. Véase, por ejemplo, Ausubel y col., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY; y Krieglner, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

Las condiciones de rigurosidad moderada pueden incluir lo siguiente: Paso 1: Se pretratan filtros que contienen ADN durante 6 horas a 55°C en una solución que contiene 6X SSC, 5X solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Paso 2: Se hibridizan los filtros durante 18-20 horas a 55°C en la misma solución con la adición de  $5-20 \times 10^6$  cpm de sonda  $^{32}\text{P}$ -marcada. Paso 3: Se lavan los filtros a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene 2X SSC, SDS al 0,1%, luego se lavan dos veces durante 30 minutos a 60°C en una solución que contiene 1X SSC y SDS al 0,1%. Paso 4: Se secan los filtros y se exponen a la autorradiografía. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de rigurosidad moderada que se pueden utilizar. Véase, por ejemplo, Ausubel y col., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY; y Krieglner, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

La baja rigurosidad puede incluir: Paso 1: Se pretratan los filtros que contienen ADN durante 6 horas a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH de 7,5), 5 mM EDTA, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y 500  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Paso 2: Se hibridizan los filtros durante 18-20 horas a 40°C en la misma solución con la adición de PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, 100  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de esperma de salmón, sulfato de dextrano al 10% (peso/ volumen) y  $5-20 \times 10^6$  cpm de sonda  $^{32}\text{P}$ -marcada. Paso 3: Se lavan los filtros durante 1,5 horas a 55°C en una solución que contiene 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH de 7,4), 5 mM de EDTA y SDS al 0,1%. La solución de lavado se sustituye por una solución fresca y se incuba durante 1,5 horas más a 60°C. Paso 4: Se secan los filtros y se exponen a autorradiografía. Si es necesario, se lavan los filtros por tercera vez a 65-68°C y se vuelven a exponer a la película. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de baja rigurosidad que se pueden utilizar (por ejemplo, tal como se emplea para hibridaciones entre especies). Véase, por ejemplo, Ausubel y col., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOL IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY; and Krieglner, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

### *Péptidos Quiméricos que incluyen Dominios Inhibidores de JNK y un Dominio de Tráfico*

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de péptidos quiméricos seleccionándose de entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ IDs 11-16 y 23-26, o un péptido que es al menos en un 95% homólogo a estos péptidos, tal como se define anteriormente, que incluye un primer y un segundo dominio, para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un sujeto, caracterizado porque el péptido impide que se dañen los estereocilios de las células pilosas, la apoptosis de las células pilosas o la apoptosis neuronal. El primer dominio incluye una secuencia de rastreo, mientras que el segundo dominio incluye una secuencia inhibidora de JNK enlazada por un enlace covalente, por ejemplo un enlace peptídico, al primer dominio. El primero y segundo dominios pueden aparecer en cualquier orden en el péptido y el péptido puede incluir uno o más de cada dominio.

## ES 2 319 454 T3

Una secuencia de tráfico es una secuencia de aminoácidos que dirige un péptido en el que está presente hacia un destino celular deseado. Así, la secuencia de tráfico puede dirigir el péptido a través de la membrana plasmática, por ejemplo desde fuera de la célula, por la membrana plasmática, y dentro del citoplasma. Alternativa o adicionalmente, la secuencia de tráfico puede dirigir el péptido hacia un lugar deseado dentro de la célula, por ejemplo hacia el núcleo, el ribosoma, el ER, un lisosoma o un peroxisoma.

En algunas realizaciones, el péptido de tráfico procede de una secuencia conocida de translocación de membrana. Por ejemplo, el péptido de tráfico puede incluir secuencias procedentes de la proteína TAT 1 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Esta proteína se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.804.604 y 5.674.980. El péptido inhibidor de JNK puede estar enlazado a algunos de los 86 aminoácidos totales que conforman la proteína TAT. Aquí, se puede utilizar un fragmento o una parte funcionalmente eficaz de una proteína TAT que posee menos de 86 aminoácidos que muestra captación en las células, y opcionalmente captación en el núcleo celular. Véase, por ejemplo, Vives y col., *J. Biol. Chem.*, 272(25):16010-17 (1997). En una realización, el fragmento incluye un péptido que contiene los residuos 48-57 de TAT, por ejemplo, NH<sub>3</sub>-GRKKRRQRRR-COOH [SEQ ID NO:7] o una secuencia genérica de TAT NH<sub>3</sub>-X<sub>n</sub>-RKKRRQRRR-X<sub>n</sub>-COOH [SEQ ID NO:9]. Un péptido de TAT que incluye la región que media la entrada y captación en las células se puede definir por medio de técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Franked y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 7397-7401 (1989).

La secuencia de TAT puede estar enlazada al extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia inhibidora de JNK. Se puede añadir una bisagra de dos residuos prolina entre la TAT y el péptido inhibidor de JNK para crear el péptido de fusión total. Por ejemplo, los péptidos de fusión con L-aminoácidos utilizados aquí pueden ser el péptido L-TAT-IB1 [SEQ ID NO:11], el péptido L-TAT-IB2 [SEQ ID NO:12], o el péptido genérico L-TAT-IB [SEQ ID NO:13]. Alternativamente, los péptidos de fusión de L-aminoácidos pueden ser el péptido genérico L-TAT-JNKI [SEQ ID NO:25]. Los péptidos de fusión retro-inversos D pueden ser el péptido D-TAT-IB1 [SEQ ID NO:14], el péptido D-TAT-IB2 [SEQ ID NO:15] o el péptido genérico D-TAT-IB [SEQ ID NO:16]. Alternativamente, los péptidos de fusión retro-inversos D pueden incluir el péptido D-TAT-JNKI [SEQ ID NO:22] o el péptido genérico D-TAT-JNKI [SEQ ID NO:26]. El péptido de TAT puede ser un péptido retro-inverso D que tiene la secuencia NH<sub>2</sub>-X<sub>n</sub>-RRRQRRKKR-X<sub>n</sub>-COOH [SEQ ID NO:10]. En la SEQ ID NOs: 5-6, 9-10, 13, 16 y 25-26, el número de residuos "X" no se limita al que se describe y puede igualar cualquier número de residuos de aminoácidos, incluido cero, y puede variar tal como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de tráfico puede ser una secuencia única (es decir continua) de aminoácidos presentes en la secuencia de TAT. Alternativamente, pueden ser secuencias de dos o más aminoácidos que están presentes en la proteína TAT, pero que en la proteína natural están separadas por otras secuencias de aminoácidos. Tal como se utiliza aquí, la proteína TAT incluye una secuencia de aminoácidos natural que es la misma que la de la proteína TAT natural, o su proteína equivalente funcional, o fragmentos funcionalmente equivalentes de la misma (péptidos). Estas proteínas equivalentes funcionales o fragmentos funcionalmente equivalentes poseen una actividad de captación en la célula y en el núcleo de la célula que es sustancialmente similar a la de la proteína TAT natural. La proteína TAT se puede obtener a partir de fuentes naturales o se puede producir utilizando técnicas de ingeniería genética o de síntesis química.

La secuencia de aminoácidos de la proteína TAT natural de VIH se puede modificar, por ejemplo, mediante adición, delección y/o sustitución de al menos un aminoácido presente en la proteína TAT natural, para producir la proteína TAT modificada (también denominada aquí proteína TAT). La proteína TAT modificada o los análogos peptídicos de TAT con estabilidad aumentada o reducida se pueden producir por medio de técnicas conocidas. En algunas realizaciones, las proteínas TAT o los péptidos incluyen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente similares, aunque no idénticas, a las de la proteína TAT natural o a partes de la misma. Además, se puede añadir colesterol u otros derivados lipídicos a la proteína TAT para producir una TAT modificada con una mayor solubilidad en la membrana.

Se pueden diseñar variantes de la proteína TAT para modular la localización intracelular de TAT - péptido inhibidor de JNK. Cuando se añaden de forma exógena, estas variantes se diseñan habitualmente para que se conserve la capacidad de TAT para penetrar en las células (es decir, la captación de la proteína TAT o del péptido variante en la célula es sustancialmente similar a la de la TAT natural del VIH). Por ejemplo, la alteración de la región básica que se considera importante para la localización nuclear (véase, por ejemplo, Dang y Lee, *J. Biol. Chem.* 264: 18019-18023 (1989); Hauber y col., *J. Virol.* 63: 1181-1187 (1989); Ruben y col., *J. Virol.* 63: 1-8 (1989)) puede resultar en una localización citoplásmica o en una localización parcialmente citoplásmica de TAT y, por tanto, del péptido inhibidor de JNK. Alternativamente, se puede introducir una secuencia para unir un elemento citoplásmico o cualquier otro componente o compartimento (por ejemplo retículo endoplásmico, mitocondria, el aparato de Bloom, vesículas lisosomales) en la TAT con el fin de conservar la TAT y el péptido inhibidor de JNK en el citoplasma o en cualquier otro compartimento para otorgar una regulación a la captación de TAT y del péptido inhibidor de JNK.

Otras fuentes para el péptido de tráfico incluyen, por ejemplo, VP22 (descrito, por ejemplo, en la WO 97/05265; Elliott y O'Hare, *Cell* 88: 223-233 (1997)) o proteínas no virales (Jackson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10691-10695 (1992)).

La secuencia inhibidora de JNK y la secuencia de tráfico pueden enlazarse mediante acoplamiento químico de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Numerosos métodos conocidos de reticulación química no son específicos, es decir que no dirigen el punto de acoplamiento hacia ningún lugar particular del polipéptido de transporte

o la macromolécula de carga. En consecuencia, la utilización de agentes reticulantes no específicos puede atacar los lugares funcionales o bloquear estéricamente los lugares activos, transformando las proteínas conjugadas en biológicamente inactivas.

5 Una forma de aumentar la especificidad de acoplamiento consiste en dirigir el acoplamiento químico hacia un grupo funcional que aparece solamente una vez o pocas veces en uno de los polipéptidos o en los dos que hayan de ser reticulados. Por ejemplo, en muchas proteínas, la cisteína, que es el único aminoácido proteico que contiene un grupo tiol, aparece sólo pocas veces. Asimismo, por ejemplo, si un polipéptido no contiene residuos de lisina, un reactivo reticulante específico de amina primaria será selectivo con el extremo amino de aquel polipéptido. La utilización con éxito de esta aproximación para aumentar la especificidad de acoplamiento requiere que el polipéptido tenga los 10 residuos adecuadamente raros y reactivos en zonas de la molécula que se pueden alterar sin pérdida de la actividad biológica de la misma.

Los residuos de cisteína se pueden sustituir cuando aparecen en partes de una secuencia de polipéptidos donde su participación en una reacción de reticulación de otro modo interferiría probablemente en la actividad biológica. Cuando se sustituye un residuo de cisteína, normalmente es deseable minimizar los cambios resultantes en la multiplicación de polipéptidos. Los cambios en la multiplicación de polipéptidos se minimizan cuando la sustitución es química y estéricamente similar a la cisteína. Por estas razones, se prefiere la serina como sustitución para la cisteína. Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, se puede introducir un residuo de cisteína en una secuencia de aminoácidos polipeptídicos con propósitos de reticulación. Cuando se introduce un residuo de cisteína, se prefiere la introducción en o cerca del extremo amino o carboxi. Se dispone de métodos convencionales para estas modificaciones de la secuencia de aminoácidos, para que el polipéptido de interés se produzca mediante síntesis química o por expresión de ADN recombinante.

El acoplamiento de los dos constituyentes se puede llevar a cabo mediante un agente de acoplamiento o conjugación. Existen diversos reactivos de reticulación intermolecular que se pueden utilizar. Véase, por ejemplo, Means y Feeney, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Entre estos reactivos se encuentran, por ejemplo, J-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o N,N-(1,3-fenil) bismaleimida (siendo ambos altamente específicos de los grupos sulfhidrilo y formando enlaces irreversibles); N,N-etilen-bis(yodoacetamida) u otro reactivo que tenga de 6 a 11 puentes de carbono metilénicos (que son relativamente específicos de los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con los grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación útiles para este propósito incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma reticulaciones irreversibles con grupos amino y fenólicos); dimetil-adipimidato (que es específico de los grupos amino); fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con los grupos amino); hexametileno-diisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con los grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona esencialmente con la tirosina e histidina).

Los reactivos de reticulación pueden ser homobifuncionales, es decir con dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferente es el bismaleimidohexano ("BMH"). El BMH contiene dos grupos maleimida funcionales que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo bajo condiciones suaves (pH de 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están unidos por una cadena hidrocarburo. Por tanto, el BMH sirve para la reticulación irreversible de polipéptidos que contienen residuos de cisteína.

Los reactivos de reticulación pueden ser también heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo amino-reactivo y un grupo tiol-reactivo, que reticularán dos proteínas que tienen aminas y tioles libres, respectivamente. Ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales son succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC"), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster ("MBS"), y succinimida-4-(p-maleimidofenil)butirato ("SMPB"), análogo de cadena alargada de MBS. El grupo succinimidilo de estos reticulantes reacciona con una amina primaria y la maleimida tiol-reactiva forma un enlace covalente con el tiol de un residuo de cisteína.

Los reactivos de reticulación a menudo tienen baja solubilidad en agua. Una parte hidrofílica, tal como un grupo sulfonato, se puede añadir al reactivo de reticulación para mejorar su solubilidad en agua. El sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados para su solubilidad en agua.

Numerosos reactivos de reticulación producen un conjugado que es esencialmente no segmentable en condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de reticulación contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es segmentable en condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditio-bis(succinimidilpropionato) ("DSP") y N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato ("SPDP") son reticulantes segmentables bien conocidos. La utilización de un reactivo de reticulación segmentable permite que la parte de carga se separe del polipéptido de transporte después de su suministro a la célula diana. El enlace directo a disulfuro puede ser también útil.

Numerosos reactivos de reticulación, incluidos los expuestos anteriormente, son comerciales. Las instrucciones detalladas para su uso son proporcionadas fácilmente por los suministradores comerciales. Una referencia general sobre la reticulación de proteínas y preparación de conjugados es: Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING, CRC Press (1991).

## ES 2 319 454 T3

La reticulación química puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre las partes conjugadas y ayudan así a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede tener la forma de una parte polipeptídica que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo, prolina. Alternativamente, un brazo espaciador puede formar parte del reactivo de reticulación, tal como en “SPDP de larga cadena” (Pierce Chem. Co., Rockford, IL., cat. No. 21651 H).

Alternativamente, el péptido quimérico se puede producir como un péptido de fusión que incluye la secuencia de tráfico y la secuencia inhibidora de JNK que se pueden expresar adecuadamente en células huésped apropiadas conocidas. Los péptidos de fusión tal como se describen aquí pueden formarse y utilizarse de manera análoga o fácilmente adaptable a partir de técnicas de ADN recombinante estándar, tal como se ha descrito anteriormente, así como por ELISA y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en la técnica. En una realización específica, la selección de anticuerpos que son específicos de un dominio particular de un péptido inhibidor de JNK se facilita mediante la generación de hibridomas que se unen al fragmento de un péptido inhibidor de JNK que posee un dominio como éste. Se proporcionan asimismo aquí anticuerpos que son específicos de un dominio dentro de un péptido inhibidor de JNK, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo.

Los anticuerpos anti-péptido inhibidor de JNK se pueden utilizar en métodos conocidos en la técnica en relación a la localización y/o cuantificación de un péptido inhibidor de JNK (por ejemplo, para su uso en niveles de medición del péptido en muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en métodos de diagnóstico, para su uso en la formación de imágenes del péptido y similares). En una determinada realización, los anticuerpos para los péptidos inhibidores de JNK, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos, que contienen el dominio de unión derivado del anticuerpo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (en adelante “Productos Terapéuticos”).

*Utilización de los péptidos definidos anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos*

### *Pérdida de audición*

Se incluye también en la invención la utilización de los péptidos de la invención para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la pérdida de audición mediante la administración a un sujeto de un Producto Terapéutico, es decir de un péptido bioactivo permeable de la invención tal como se ha definido anteriormente, donde el péptido impide que se dañen los estereocilios de las células pilosas, la apoptosis de las células pilosas o la apoptosis neuronal. Preferentemente, el Producto Terapéutico es el péptido que incluye la SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 y 22 o es la SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 24, 25 ó 26.

La exposición a ruidos fuertes provoca la pérdida de la audición inducida por ruido (NIHL) debido a un daño del órgano de Corti. La NIHL depende tanto del nivel de ruido como de la duración de la exposición. La pérdida de audición puede ser temporal (TTS) si un mecanismo reparador puede rehabilitar el órgano de Corti. Sin embargo, se vuelve permanente (PTS) cuando mueren las células pilosas o las neuronas. Los correlatos estructurales del trauma acústico son de dos tipos: (1) leve daño en la sinapsis y/o en los estereocilios de las células pilosas que se puede reparar y explica la TTS y su recuperación, y (2) grave daño que causa la apoptosis de las células pilosas y neuronales que no se puede reparar y explica la PTS.

El Producto Terapéutico debe ser administrado al sujeto antes de su exposición a un trauma acústico, antibiótico o agente quimioterapéutico. Alternativamente, el Producto Terapéutico debe ser administrado después de que el sujeto haya estado expuesto a un trauma acústico, antibiótico o agente quimioterapéutico.

Un trauma acústico es un ruido suficiente para dañar el Corti. Por ejemplo, un trauma acústico es de al menos 70 dB SPL, de al menos 90 dB SPL o de al menos 100 dB SPL, de al menos 120 dB SPL o de al menos 130 dB SPL.

Los antibióticos incluyen, por ejemplo, penicilinas tales como la penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, dicloxacilina y oxacilina; cefalosporinas tales como cefalexina (Keflex), cefaclor (Ceclor) y cefixima (Suprax); aminoglicósidos tales como tobramicina y estreptomina; macrólidos tales como eritromicina, azitromicina (Zithromax) y claritromicina; sulfonamidas tales como trimetoprim-sulfametoxazol o tetracilinas tales como tetraciclina o doxiciclina.

### *Composiciones farmacéuticas*

El Producto Terapéutico puede incluir, por ejemplo: (i) uno o más de cualquiera de los péptidos inhibidores de JNK de la invención, que incluyen cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre las SEQ ID NOs: 3-6 y 22, seleccionándose cualquiera de las secuencias de aminoácidos de entre las SEQ ID NOs. 11-16 y 23-26, o un péptido que sea al menos en un 95% homólogo a estos péptidos, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos; y (ii) ácidos nucleicos que codifican estos péptidos inhibidores de JNK, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos.

El término “terapéuticamente eficaz” significa que la cantidad de péptido inhibidor, por ejemplo, que se emplea es suficiente para mejorar el trastorno asociado a JNK, es decir la pérdida de audición que no esté abarcada por la presente invención. El término “tratamiento” incluye la administración de un reactivo que modula la actividad de la

## ES 2 319 454 T3

quinasa JNK tal como se ha definido anteriormente. El término “modular” incluye la supresión de la expresión de la JNK cuando está sobreexpresada. Incluye asimismo la supresión de la fosforilación de c-jun, ATF2 o NFAT4, por ejemplo mediante la utilización de un péptido que incluye las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3-6 y 22 o es la SEQ ID NOs: 11-16 y 23-26, como inhibidor competitivo del lugar de unión natural de c-jun ATF2 y NFAT4 en una célula. Por tanto, incluye también la supresión de los complejos hetero- y homo-méricos de los factores de transcripción compuestos por c-jun, ATF2 o NFAT4 y sus asociados relacionados, por ejemplo el complejo AP-1 que está compuesto de c-jun, AFT2 y c-fos.

En algunos casos, “modular” puede incluir aumentar la expresión de JNK, por ejemplo utilizando un anticuerpo específico del péptido IB que bloquea la unión de un péptido IB a JNK, impidiendo así la inhibición de JNK por el péptido asociado a IB. Los péptidos, péptidos de fusión y ácidos nucleicos inhibidores de JNK de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las sustancias mencionadas anteriormente, excipientes, soportes, tampones, estabilizantes farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza exacta del soporte o de otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal, intraauricular o parche.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden tener forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede incluir un soporte sólido tal como una gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen en general un soporte líquido como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, un aceite mineral o un aceite sintético. Se puede incluir una solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o para una inyección local en el lugar del padecimiento, el ingrediente activo tendrá la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos especialistas en la materia pueden preparar fácilmente soluciones adecuadas mediante, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como la Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactato. Se pueden incluir, según se necesiten, conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Cuando se deba proporcionar a un individuo un polipéptido, un péptido o una molécula ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la administración se realiza preferentemente en una “cantidad profilácticamente eficaz” o en una “cantidad terapéuticamente eficaz” (según sea el caso, aunque la profilaxis se pueda considerar como terapia) suficiente que beneficie al individuo. La cantidad real administrada, así como la velocidad y la duración de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., es responsabilidad del médico generalista y demás médicos, y tiene en cuenta típicamente el trastorno a tratar, el estado del paciente particular, el lugar de suministro, el método de administración y demás factores conocidos por los médicos. Los ejemplos de técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

Alternativamente, se pueden utilizar terapias diana para suministrar el agente activo de forma más específica a ciertos tipos de células, mediante la utilización de sistemas diana tales como ligandos específicos de anticuerpos o células. El direccionamiento puede ser deseable por varias razones; por ejemplo cuando el agente es inaceptablemente tóxico o si necesitara de otro modo una dosificación demasiado alta, o si no pudiera de otro modo entrar en las células diana.

En lugar de administrar estos agentes directamente, podrían ser producidos en las células diana mediante la expresión de un gen codificador introducido en las células, por ejemplo en un vector viral (una variante de la técnica VDEPT - véase a continuación). El vector podría ser direccionado hacia las células específicas a tratar o podría contener elementos reguladores que se conectan de forma más o menos selectiva por las células diana.

Alternativamente, el agente podría administrarse en forma de un precursor para la conversión en una forma activa por un agente activador producido en, o direccionado hacia, las células a tratar. Este tipo de aproximación se conoce a veces como ADEPT o VDEPT; el primero implicando el direccionamiento del agente activador hacia las células mediante la conjugación a un anticuerpo celular específico, mientras que el último implica la producción del agente activador, por ejemplo un péptido inhibidor de JNK, en un vector mediante la expresión procedente del ADN de codificación en un vector viral (véase por ejemplo, la EP-A-415731 y WO 90/07936).

En una realización específica de la presente invención, los ácidos nucleicos que incluyen una secuencia que codifica un péptido inhibidor de JNK incluyendo cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre las SEQ ID NOs: 3-6 y 22, o siendo cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre las SEQ ID NOs: 11-16 y 23-26, en un péptido que sea al menos en un 95% aproximadamente homólogo a estos péptidos, o derivados funcionales del mismo, se pueden administrar con una composición farmacéutica para modular las rutas de señales activadas de la JNK por medio de una terapia genética. En realizaciones más específicas, uno o más ácidos nucleicos que codifican un péptido inhibidor de JNK tal como se ha definido anteriormente se pueden administrar por medio de una terapia genética. La terapia genética se refiere a una terapia que se lleva a cabo mediante la administración a un

sujeto de un ácido nucleico específico. En esta realización de la presente invención, el ácido nucleico produce su(s) péptido(s) codificado(s), que sirve(n) luego para ejercer un efecto terapéutico mediante su función moduladora de la enfermedad o trastorno, es decir la pérdida de audición. Cualquiera de las metodologías relacionadas con la terapia genética disponibles en la técnica se puede utilizar con este propósito. Véase, por ejemplo, Goldspiel y col., 1993. Clin. Pharm. 12:488-505.

El Producto Terapéutico puede comprender además un ácido nucleico que es parte de un vector de expresión que expresa uno o más de cualquiera de los péptidos asociados a IB, los péptidos asociados a JBD<sub>20</sub> o fragmentos, derivados o análogos de los mismos, tal como se ha definido anteriormente, dentro de un huésped adecuado. Un ácido nucleico como este puede poseer un promotor que esté ligado de forma operable a la(s) region(es) de codificación de un péptido inhibidor de JNK. El promotor puede ser inducible o constitutivo y opcionalmente, específico del tejido. La molécula de ácido nucleico puede comprender además secuencias de codificación (y cualquier otra secuencia deseada) que estén flanqueadas de regiones que favorecen la recombinación homóloga en un lugar deseado dentro del genoma, previendo así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935.

El suministro de este ácido nucleico del Producto Terapéutico a un paciente puede ser directo (es decir, se expone directamente el paciente al ácido nucleico o al vector que contiene el ácido nucleico) o indirectamente (es decir, las células se transforman primero con el ácido nucleico *in vitro*, luego se transplantan en el paciente). Estas dos aproximaciones se conocen, respectivamente, como terapia *in vivo* o *ex vivo*. Este ácido nucleico se puede administrar directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el producto codificado. Esto se puede llevar a cabo mediante cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la construcción del ácido nucleico como parte de un vector apropiado de expresión del ácido nucleico y la administración del mismo de manera tal que se convierta en intracelular (por ejemplo, mediante infección utilizando un vector retroviral defectivo o atenuado u otro vector viral; véase la patente de Estados Unidos N° 4.980.286); inyectando directamente ADN desnudo; utilizando bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un “Gene Gun®; Biolistic, DuPont); recubriendo los ácidos nucleicos con lípidos; utilizando agentes transfectantes/receptores en la superficie celular asociada; encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; administrándolo en un enlace a un péptido conocido por penetrar en el núcleo; o administrándolo en un enlace a un ligando predispuesto a la endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), que se puede utilizar para “enfocar” tipos de células que expresan específicamente los receptores de interés, etc.

Una aproximación ilustrativa adicional a la terapia genética puede incluir la transferencia de un gen en células en un cultivo de tejido *in vitro* por medio de métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, infección viral o similares. En general, el método de transferencia incluye la transferencia concomitante de un marcador de selección a las células. Las células se colocan entonces bajo una presión de selección (por ejemplo resistencia a los antibióticos) para facilitar el aislamiento de aquellas células que han recogido, y están expresando, el gen transferido. Aquellas células se pueden suministrar a un paciente. En una realización específica, antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante, se introduce el ácido nucleico en una célula mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o con bacteriofagos que contienen secuencias de ácido nucleico de interés, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos y metodologías similares, que aseguran que las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras no son interrumpidas por la transferencia. Véase, por ejemplo, Loeffler and Behr, 1993. Meth. Enzymol. 217:599-618. La técnica elegida debe prever la transferencia estable del ácido nucleico a la célula para que el ácido nucleico pueda ser expresado por la célula. Típicamente, el ácido nucleico transferido puede ser heredado y expresado por la progenie celular.

Aquellas células recombinantes resultantes pueden ser suministradas a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la inyección de células epiteliales (por ejemplo, de forma subcutánea), aplicación de células recombinantes de la piel como injerto de piel en el paciente e inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células hematopoyéticas del vástago/del progenitor). La cantidad total de células que se prevén para su uso dependen del efecto deseado, estado del paciente y similares, y pueden ser determinadas por un especialista en la técnica.

Las células en las cuales se puede introducir un ácido nucleico con el propósito ilustrativo anterior de la terapia genética pueden abarcar cualquier tipo celular deseado, disponible, y pueden ser xenogénicas, heterogéneas, singéneas u autógenas. Los tipos de células pueden incluir células diferenciadas, tales como células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, y células sanguíneas, o varias células del vástago/del progenitor, en particular células musculares cardíacas embrionales, células de vástago del hígado (publicación de la patente internacional WO 94/08598), células de vástago neurales (Stemple y Anderson, 1992, Cell 71: 973-985), células hematopoyéticas del vástago o del progenitor, por ejemplo, tal como se obtienen de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y similares. Las células utilizadas para la terapia genética pueden ser además autólogas del paciente.

*Inmunoensayos*

Los péptidos de la presente invención se pueden utilizar en ensayos (por ejemplo, inmunoensayos) para detectar, pronosticar, diagnosticar o comprobar los estados, enfermedades y trastornos mencionados anteriormente caracterizados por niveles aberrantes de JNK o por un péptido inhibidor de JNK, o para controlar el tratamiento del mismo. “Nivel aberrante” significa un incremento o reducción del nivel en una muestra con respecto al que está presente en una muestra análoga procedente de una parte no afectada del cuerpo, o de un sujeto que no tiene trastorno alguno. El inmunoensayo se puede llevar a cabo mediante un método que comprende poner en contacto una muestra procedente de un paciente con un anticuerpo en condiciones tales que pueda tener lugar la unión inmuno-específica, y posteriormente la detección o medida de la cantidad de toda unión inmuno-específica por el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo específico de un péptido inhibidor de JNK se puede utilizar para analizar una muestra de tejido o de suero de un paciente en busca de la presencia de JNK o de un péptido inhibidor de JNK; siendo un nivel aberrante de JNK o de un péptido inhibidor de JNK indicativo de un estado de enfermedad. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen sistemas de ensayos competitivos y no competitivos, empleando técnicas tales como Western Blots, radioinmunoensayos (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos tipo “sandwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, e inmunoensayos de la proteína A, etc.

La presente invención no debe ser limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas aquí. Efectivamente, varias modificaciones de la invención además de las que están descritas aquí se evidenciarán a los especialistas en la técnica a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas.

**Ejemplos específicos**

## Ejemplo 1

*Identificación de los Péptidos Inhibidores de JNK*

Se identificaron las secuencias de aminoácidos importantes para la interacción eficaz con JNK por las alineaciones de las secuencias entre los JBDs conocidos. La comparación de secuencias entre los JBDs de IB1 [SEQ ID NO:17], IB2 [SEQ ID NO:18], c-Jun [SEQ ID NO:19] y ATF2 [SEQ ID NO:20] definió una secuencia de 8 aminoácidos débilmente conservada (Fig. 1A). Como los JBDs de IB1 e IB2 son aproximadamente 100 veces más eficaces que c-Jun o ATF2 en la unión a JNK (Dickens y col., *Science* 277: 693 (1997)), se pensó que los residuos conservados entre IB1 e IB2 deberían ser importantes para conferir la máxima unión. La comparación entre los JBDs de IB1 e IB2 definió dos bloques de siete y tres aminoácidos altamente conservados entre las dos secuencias. Estos dos bloques están incluidos en una secuencia peptídica de 23 aminoácidos en IB1 [SEQ ID NO: 1] y de 21 aminoácidos en IB2 [SEQ ID NO: 2]. Estas secuencias se muestran en la Fig. 1B, las rayas en la secuencia IB2 indican un espacio en la secuencia con el fin de alinear los residuos conservados.

Los péptidos inhibidores de JNK (JNKI) de la presente invención se obtuvieron uniendo el motivo de unión de JIP-1/IB1 a la JNK de 20 aminoácidos, denominado aquí JBD<sub>20</sub>, a una proteína de tráfico, por ejemplo la secuencia transportadora HIV-TAT<sub>48-57</sub> de 10 aminoácidos.

## Ejemplo 2

*Preparación de las Proteínas de Fusión Inhibidoras de JNK*

Se sintetizaron proteínas de fusión inhibidoras de JNK enlazando de forma covalente el extremo C-terminal de JBD<sub>23</sub> o la secuencia de 21 aminoácidos procedente del JBD de IB2 (JBD<sub>21</sub>) o el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos JBD<sub>20</sub> a un péptido transportador de 10 aminoácidos de longitud N-terminal procedente de VIH-TAT<sub>48-57</sub> (Vives y col., *J. Biol. Chem.* 272: 16010 (1997)) a través de un espaciador compuesto de dos residuos de prolina. Este espaciador se utilizó para permitir la máxima flexibilidad e impedir cambios estructurales secundarios no deseados. Como se muestra en la Fig. 1C, estas preparaciones se designaron L-TAT [SEQ ID NO:7], L-TAT-IB1 [SEQ ID NO: 11], L-TAT-IB2 [SEQ ID NO: 12] y L-TAT-JNKI1 [SEQ ID NO:21], respectivamente. Todos los péptidos de fusión TAT de los péptidos retro-inversos D se sintetizaron también y se designaron D-TAT [SEQ ID NO: 8], D-TAT-IB1 [SEQ ID NO: 14] y D-TAT-JNKI1 [SEQ ID NO: 22] respectivamente. Todos los péptidos D y L se produjeron mediante síntesis simulada F clásica y se analizaron después por Espectrometría de Masas. Se purificaron finalmente por HPLC. Para determinar los efectos del espaciador de prolina, se produjeron dos tipos de péptido TAT, uno con y uno sin dos prolinas. No parece que la adición de las dos prolinas modifique la entrada o la localización del péptido TAT en las células interiores.

Los péptidos genéricos que muestran los residuos de aminoácidos conservados se muestran en la Fig. 2. Una “X” indica cualquier aminoácido. El número de X en un péptido determinado no se limita al que se describe y puede variar (es decir, X puede representar cualquier número de residuos de aminoácidos, incluyendo cero). Véase arriba para una descripción más detallada de las secuencias genéricas.



## Ejemplo 3

*Inhibición de la Muerte de Células- $\beta$  por JBD<sub>23</sub>*

5 Se estudiaron entonces los efectos de la secuencia de JBD de 23 aminoácidos de longitud de IB1 sobre las actividades biológicas de la JNK. La secuencia de 23 aminoácidos estaba enlazada en el N-terminal a la Proteína Fluorescente Verde (constructo GFP-JBD<sub>23</sub>), y se evaluó el efecto de este constructo sobre la apoptosis de células- $\beta$  pancreáticas inducida por IL-1 $\beta$ . Véase la Fig. 3. Se demostró previamente que este modo de apoptosis había sido bloqueado por la transfección con JBD<sub>1-280</sub>, mientras que los inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 no se protegieron. Véase  
10 Ammendrup y col, más arriba.

Los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de 23 aminoácidos (JBD<sub>23</sub>; Fig. 1B) y una secuencia mutada en las regiones totalmente conservadas (JBD<sub>23mut</sub>) fueron sintetizados e insertados direccionalmente en los sitios EcoRI y SalI del vector pEGFP-N1 que codifica la Proteína Fluorescente Verde (GFP) (de Clontech). Se cultivaron células  
15  $\beta$ TC-3 productoras de insulina en un medio RPMI 1640 complementado con Suero de Ternera Fetal al 10%, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM de glutamina. Las células  $\beta$ TC-3 productoras de insulina fueron transfectadas con los vectores indicados y se añadió IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) al medio de cultivo celular. El número de células apoptóticas se contó 48 horas después de la adición de IL-1 $\beta$  utilizando un microscopio de fluorescencia invertido. Se distinguieron las células apoptóticas de las células normales por la “formación de ampollas”  
20 características en el citoplasma y se contaron después de dos días.

Tal como se indica en la Fig. 3, GFP es el vector de expresión de la Proteína Fluorescente Verde utilizado como control; JBD23 es el vector que expresa una GFP quimérica enlazada a la secuencia de 23 aminoácidos procedente del JBD de IB1; JBD23Mut es el mismo vector que GFP-JBD23, pero con un JBD mutado en cuatro residuos conservados  
25 mostrados en la Fig 1B; y JBD280 es el vector de GFP enlazado al JBD entero (aminoácidos 1-280). La construcción que expresa GFP-JBD<sub>23</sub> impidió la apoptosis de células  $\beta$  pancreáticas inducida por IL-1 $\beta$  tan eficazmente como el JBD<sub>1-280</sub> entero (Fig. 3, 7BD23/IL-1 comparado con JBD280/IL-1). Como controles adicionales, las secuencias mutadas en los residuos de IB1 totalmente conservados tenían una capacidad muy reducida de impedir la apoptosis (Fig. 3, JBD23Mut/IL-1).  
30

## Ejemplo 4

*Importación Celular de los Péptidos TAT-IB1 y TAT-IB2*

35 Se evaluó la capacidad de las formas L- y D-enantioméricas de los péptidos TAT, TAT-IB1 y TAT-IB2 (“péptidos TAT-IB”) para penetrar en las células.

Los péptidos L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1, L-TAT-IB2 y D-TAT-IB1 [SEQ ID NOs: 7, 8, 11, 12 y 14, respectivamente] fueron marcados por adición N-terminal de un residuo de glicina conjugado a fluoresceína. Los péptidos marcados (1  $\mu$ M) se añadieron a los cultivos de células  $\beta$ TC-3, que se mantuvieron tal como se describe en el Ejemplo 3. En ciertos momentos predeterminados, se lavaron las células con PBS y se fijaron durante cinco minutos en metanol-acetona (1:1) helado antes de ser examinadas bajo microscopio de fluorescencia. Se utilizó como control BSA marcado con fluoresceína (1  $\mu$ M, 12 mol/mol de BSA). Los resultados demostraron que todos los péptidos marcados  
40 con fluoresceína anteriores habían penetrado eficaz y rápidamente (menos de cinco minutos) en las células una vez añadidos al medio de cultivo. A la inversa, la seroalbúmina bovina marcada con fluoresceína (1  $\mu$ M de BSA, 12 mol de fluoresceína/mol de BSA) no penetró en las células.

Un estudio de medición indicó que la intensidad de la señal fluorescente para los péptidos L-enantioméricos se redujo en un 70% después de un período de 24 horas. Después de 48 horas había pocas señales o ninguna señal. Por contraste, D-TAT y D-TAT-IB1 eran extremadamente estables dentro de las células. Las señales fluorescentes procedentes de todos estos péptidos retro-inversos D seguían siendo muy fuertes 1 semana más tarde, y la señal había disminuido sólo apenas a las 2 semanas después del tratamiento.  
50

## Ejemplo 5

*Inhibición in vitro de la Fosforilación de c-JUN, ATF2 y Elk1*

60 Se investigaron *in vitro* los efectos de los péptidos sobre la fosforilación mediada por las JNKs de sus factores de transcripción diana. Se produjeron JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes y no activados por medio de un kit de TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN de lisados de reticulocitos de conejo (Promega) y se utilizaron en ensayos de quinasa en fase sólida con c-Jun, ATF2 y Elk1, solos o fundidos a glutathion-S-transferasa (GST), como sustrato. Se realizaron estudios dosis-respuesta donde los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2 (0-25  $\mu$ M) se mezclaron con las quinasas JNK1, JNK2 o JNK3 recombinantes en el tampón de reacción (20 mM Tris-acetato, 1 mM EGTA, 10 mM *p*-nitrofenil-fosfato (pNPP), 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM *p*-glicerofosfato, 1 mM de ditioneitol) durante  
65 20 minutos. Las reacciones de las quinasas se iniciaron entonces mediante la adición de 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 5  $\mu$ Ci de <sup>33</sup>P- $\gamma$ -dATP y 1  $\mu$ g de GST-Jun (aminoácidos 1-89), GST-AFT2 (aminoácidos 1-96) o GST-ELK1 (aminoácidos 307-

## ES 2 319 454 T3

428). Las proteínas de fusión con GST se compraron a Stratagene (La Jolla, CA). Se añadieron también a la mezcla diez  $\mu\text{l}$  de perlas de glutatión-agarosa. Los productos de reacción se separaron entonces por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturalizante. Se secaron los geles y se expusieron posteriormente a películas de rayos X (Kodak). Se observó una inhibición casi completa de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 por las JNKs a dosis de péptidos TAT-IB tan bajas como de 2,5  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la excepción notable fue la ausencia de inhibición por TAT-IB de la fosforilación por JNK3 de Elk1. En general, el péptido TAT-IB1 apareció ligeramente superior a TAT-IB2 en la inhibición de la fosforilación de la familia de JNK de sus factores de transcripción diana (Véase la Fig. 4A).

La capacidad de los péptidos D-TAT, D-TAT-IB1 y L-TAT-IB1 (estudio con dosificación de 0-250  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la fosforilación de GST-Jun (aminoácidos 1-73) por JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes se analizó tal como se ha descrito anteriormente. En general, el péptido D-TAT-IB1 redujo la fosforilación mediada por JNK de c-Jun, pero a niveles aproximadamente 10-20 veces menos eficaces que L-TAT-IB1 (Véase la Fig. 4B).

### Ejemplo 6

#### *Inhibición de la Fosforilación de c-JUN por las JNK Activadas*

Se evaluaron los efectos de los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ó L-TAT-IB2 sobre las JNK activadas por estímulos estresantes utilizando GST-Jun para reducir las JNK procedentes de células HeLa irradiadas con luz UV o células  $\beta\text{TC}$  tratadas con IL-1 $\beta$ . Se cultivaron células  $\beta\text{TC}$  tal como se ha descrito anteriormente. Se cultivaron las células HeLa en un medio DMEM complementado con Suero de Ternera Fetal al 10%, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM de glutamina. Una hora antes de utilizarlas para la preparación del extracto celular, se activaron las células  $\beta\text{TC}$  con IL-1 $\beta$  tal como se ha descrito anteriormente, mientras que las células HeLa fueron activadas con luz UV (20  $\text{J}/\text{m}^2$ ). Se prepararon extractos celulares a partir de células HeLa irradiadas con luz UV, de control, y células  $\beta\text{TC}$ -3 tratadas con IL-1 $\beta$  extrayendo los cultivos celulares en un tampón de lisis (20 mM Tris-acetato, 1 mM EGTA, Triton-X-100 al 1%, 10 mM *p*-nitrofenil-fosfato, 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM ditiotretiol). Se eliminaron los restos por centrifugación durante cinco minutos a 15.000 rpm en un rotor SS-34 Beckman. Se incubaron cien  $\mu\text{g}$  de extractos durante una hora a temperatura ambiente con un  $\mu\text{g}$  de GST-Jun (aminoácidos 1-89) y 10  $\mu\text{l}$  de perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Después de cuatro lavados con el tampón de extracción, se resuspendieron las perlas en el mismo tampón complementado con los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2 (25  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos. Las reacciones de las quinasas se iniciaron entonces mediante la adición de 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -dATP y se incubaron durante 30 minutos a 30°C. Los productos de reacción se separaron entonces por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturalizante. Se secaron los geles y se expusieron posteriormente a películas de rayos X (Kodak). En estos experimentos, los péptidos TAT-IB impidieron eficazmente la fosforilación de c-Jun por las JNK activadas (Véase la Fig. 6).

### Ejemplo 7

#### *Inhibición in vivo de la Fosforilación de c-JUN por los Péptidos TAT-IB*

Para determinar si los péptidos con permeabilidad celular podrían bloquear la señalización de JNK *in vivo*, utilizamos un sistema GAL4 heterólogo. Células HeLa cultivadas tal como se ha descrito anteriormente fueron cotransfectadas con el vector reporter 5xGAL-LUC junto con el constructo de expresión de GAL-Jun (Stratagene), que comprende el dominio de activación de c-Jun (aminoácidos 1-89) enlazado al dominio de unión a ADN GAL4. La activación de JNK se obtuvo mediante la cotransfección de los vectores que expresan las quinasas directamente "aguas arriba" MKK4 y MKK7 (véase, Whitmarsh y col., Science 285: 1573 (1999)). Brevemente, 3 x 10<sup>5</sup> células fueron transfectadas con los plásmidos en placas de 3,5 cm utilizando DOTAP (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los experimentos que implicaban GAL-Jun, 20 ng del plásmido fueron transfectados con 1  $\mu\text{g}$  del plásmido reporter pFR-Luc (Stratagene) y 0,5  $\mu\text{g}$  de los plásmidos de expresión MKK4 o MKK7. Tres horas después de la transfección, se cambiaron los medios celulares y se añadieron (1  $\mu\text{M}$ ) los péptidos TAT, TAT-IB1 y TAT-IB2. Se midieron las actividades de luciferasa 16 horas más tarde por medio del "Sistema del Doble Reporter" de Promega después de la normalización del contenido proteico. Como se muestra en la Fig. 5, la adición de los dos péptidos TAT-IB1 y TAT-IB2 bloqueó la activación de c-Jun después de la activación mediada por MKK4 y MKK7 de JNK. Debido a que las células HeLa expresan las isoformas tanto de JNK1 como de JNK2 pero no de JNK3, transfectamos células con JNK3. De nuevo, los dos péptidos TAT-IB inhibieron la activación mediada por JNK2 de c-Jun.

### Ejemplo 8

#### *Inhibición de la Muerte de Células- $\beta$ Pancreáticas Inducida por IL-1 $\beta$ por los Péptidos TAT-IB*

Investigamos los efectos de los péptidos L-TAT-IB sobre la promoción de la apoptosis de células- $\beta$  pancreáticas provocada por IL-1 $\beta$ . Se incubaron los cultivos celulares de  $\beta\text{TC}$ -3 durante 30 minutos con 1  $\mu\text{M}$  de los péptidos L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2 seguido de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ . Se realizó una segunda adición del péptido (1  $\mu\text{M}$ ) 24 horas más tarde. Se contaron las células apoptóticas después de dos días de incubación con IL-1 $\beta$  utilizando una tinción nuclear con yoduro de propidio (las células de color rojo son células muertas) y Hoechst 33342 (las células de color azul son

células con su membrana plasmática intacta). Como se muestra en la Fig. 5, la adición de los péptidos TAT-IB inhibió la apoptosis inducida por IL-1 $\beta$  de las células  $\beta$ TC-3 cultivadas dos días en presencia de IL-1 $\beta$ .

La inhibición a largo plazo de la muerte celular inducida por IL-1 $\beta$  se estudió mediante el tratamiento de células  $\beta$ TC-3 tal como se ha descrito anteriormente, excepto que la incubación de las células con los péptidos e IL-1 $\beta$  se mantuvo durante 12 días. Se añadieron péptidos adicionales (1  $\mu$ M) cada día y se añadieron cada 2 días IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). El péptido TAT-IB1 confiere en estas condiciones una fuerte protección contra la apoptosis. Tomados conjuntamente, estos experimentos establecen que los péptidos TAT-IB son moléculas biológicamente activas capaces de prevenir los efectos de la señalización de JNK sobre el destino celular.

#### Ejemplo 9

##### *Síntesis de un Péptido Retro-Inverso D Total*

Los péptidos de la invención pueden ser péptidos con aminoácidos D totales sintetizados al revés para prevenir la proteólisis natural (es decir, péptidos retro-inversos D totales). Un péptido retro-inverso D total de la invención proporciona un péptido con propiedades funcionales similares al péptido nativo donde los grupos laterales del componente aminoácido corresponden a la alineación del péptido nativo, pero que conservan una columna resistente a las proteasas.

Los péptidos retro-inversos de la invención son análogos sintetizados utilizando aminoácidos D mediante la unión de los aminoácidos en una cadena peptídica de modo tal que la secuencia de aminoácidos en el análogo de péptido retro-inverso sea exactamente la contraria a la secuencia en el péptido seleccionado que sirve de modelo. Para ilustrarlo, si la proteína TAT natural (formada por L-aminoácidos) tiene la secuencia GRKKRRQRRR [SEQ ID NO:7], el análogo de péptido retro-inverso de este péptido (formado por D-aminoácidos) tendrá la secuencia RRRQRRKKRG [SEQ ID NO:8]. Son conocidos en la técnica los procedimientos para sintetizar una cadena de D-aminoácidos para formar los péptidos retro-inversos. Véase, por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693 (1994); Guichard y col., J. Med. Chem. 39, 2030-2039 (1996). De forma específica, los retro-péptidos se produjeron por medio de la síntesis simulada F clásica y se analizaron después por Espectrometría de Masas. Se purificaron finalmente por HPLC.

Debido a que un problema inherente a los péptidos nativos es la degradación por las proteasas naturales y la inmunogenicidad inherente, los compuestos heterobivalentes o heteromultivalentes de esta invención se prepararán para incluir el "isómero retro-inverso" del péptido deseado. La protección del péptido contra la proteólisis natural, por tanto, tendría que aumentar la eficacia del compuesto heterobivalente o heteromultivalente específico, tanto prolongando la vida media como disminuyendo el alcance de la respuesta inmune destinada a destruir activamente los péptidos.

#### Ejemplo 10

##### *Actividad Biológica a Largo Plazo de los Péptidos IB Retro-Inversos D Totales*

La actividad biológica a largo plazo se prevé para D-TAT-IB retro-inverso que contiene el heteroconjugado peptídico cuando se compara con el análogo de L-aminoácido nativo debido a la protección del péptido D-TAT-IB contra la degradación por proteasas nativas, tal como se muestra en el Ejemplo 5.

Se analizó la inhibición de la muerte de células- $\beta$  pancreáticas inducida por IL-1 $\beta$  por el péptido D-TAT-IB1. Tal como se muestra en la Fig. 10, se incubaron las células  $\beta$ TC-3 tal como se ha descrito anteriormente durante 30 minutos con una sola adición de los péptidos indicados (1  $\mu$ M), luego se añadió IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Se contaron entonces las células apoptóticas después de dos días de incubación con IL-1 $\beta$  utilizando una tinción nuclear con yoduro de propidio y Hoechst 33342. Se contó un mínimo de 1.000 células en cada experimento. Se indica el Error Estándar de las Medias (SEM), n=5. El péptido D-TAT-IB1 redujo la apoptosis inducida por IL-1 hasta un punto similar a los péptidos L-TAT-IB (comparar la Fig. 5 y la Fig. 10).

Se analizó también la inhibición a largo plazo de la muerte celular inducida por IL-1 $\beta$  por el péptido D-TAT-IB1. Se incubaron las células  $\beta$ TC-3 tal como se hizo anteriormente durante 30 minutos con una sola adición de los péptidos indicados (1  $\mu$ M), luego se añadió IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), seguido de la adición de la citoquina cada dos días. Se contaron entonces las células apoptóticas después de 15 días de incubación con IL-1 $\beta$  utilizando una tinción nuclear con yoduro de propidio y Hoechst 33342. Observen que una sola adición del péptido L-TAT-IB1 no confiere una protección a largo plazo. Se contó un mínimo de 1.000 células en cada experimento. Se indica el Error Estándar de las Medias (SEM), n=5. Se muestran los resultados en la Fig. 9. El péptido D-TAT-IB1, pero no L-TAT-IB1, fue capaz de conferir una protección a largo plazo (15 días).

## Ejemplo 11

*Inhibición de la Muerte de Células- $\beta$  Pancreáticas Inducida por Irradiación por los Péptidos TAT-IB*

5 Se activa también JNK por radiación ionizante. Para determinar si los péptidos TAT-IB proporcionaban protección contra el daño a JNK inducido por radiación, se irradiaron (30 Gy) células “WiDr” en presencia o ausencia de los péptidos D-TAT, L-TAT-IB1 o D-TAT-IB1 (1  $\mu$ M añadido 30 minutos antes de la irradiación), tal como se indica en la Fig. 10. No se irradiaron las células control (CTRL). Se analizaron las células 48 horas más tarde por medio de tinción PI y Hoechst 33342, tal como se ha descrito anteriormente. Se indica el SEM, n=3. Ambos péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1 fueron capaces de impedir la apoptosis inducida por irradiación en esta línea celular de cáncer de colón humano.

## Ejemplo 12

15 *Radioprotección contra la Radiación Ionizante por los Péptidos TAT-IB*

Para determinar los efectos radioprotectores de los péptidos TAT-IB, se irradiaron ratones C57 B1/6 (de 2 a 3 meses de edad) con un rayo 250R de Phillips RT a una velocidad de dosificación de 0,74 Gy/min (filtro de Cu de 0,5 mm, 17 mA). Treinta minutos antes de la irradiación, se inyectaron i.p. los animales con los péptidos TAT, L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1 (30  $\mu$ l de una solución de 1 mM). Brevemente, se irradiaron los ratones como sigue: se colocaron los ratones en pequeñas cajas de plástico con la cabeza fuera de la caja. Se colocaron los animales de espaldas bajo el irradiador y se les fijó el cuello en un pequeño túnel de plástico para mantener la cabeza en una posición correcta. Se protegió el cuerpo con plomo. Antes de la irradiación, se mantuvieron los ratones con comida en gránulos estándar para ratones, sin embargo después de la irradiación los ratones fueron alimentados con una comida semilíquida que se renovó cada día.

La reacción de la mucosa labial fue registrada entonces por 2 observadores independientes de acuerdo con un sistema de registro desarrollado por Parkins y col. (Parkins y col., *Radiotherapy & Oncology*, 1: 165-173, 1983), en el que se registró el estado eritematoso así como la presencia de edema, descamación y exudación. Además, se pesaron los animales antes de cada registro de su estado eritematoso/edematoso.

La Fig. 12A ilustra el peso de los ratones después de la irradiación. Los valores se indican según el peso inicial de los ratones que fue establecido en 100. CTRL: ratones control inyectados con 30  $\mu$ l de una solución salina. n=2 para cada uno de los valores indicados, se indican los S.D. Los valores x son días.

La Fig. 12B ilustra el registro de eritema/edema después de la irradiación. Se cuantificó el estado edematoso y eritematoso del labio ventral de los mismos ratones como en la Fig. 12A. n=2 para cada valor registrado. Los valores x son días.

Los resultados de estos experimentos indican que los Péptidos TAT-IB pueden proteger contra la pérdida de peso y contra el eritema/edema asociados a la radiación ionizante.

## Ejemplo 13

*Supresión de los Factores de Transcripción de JNK por los Péptidos L-TAT-IB1*

Se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con una sonda de doble marcado de AP-1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'). Los extractos nucleares de células HeLa que fueron tratados o no durante una hora con 5 ng/ml de TNF- $\alpha$ , son tal como se indican. Los péptidos TAT y L-TAT-IB1 se añadieron 30 minutos antes de TNF- $\alpha$ . Se muestra solamente la parte del gel con el complejo ADN AP-1 específico (tal como lo demuestran los experimentos de competición con competidores no específicos y específicos no marcados). Los péptidos L-TAT-IB1 reducen la formación del complejo de unión de AP-1 a ADN en presencia de TNF- $\alpha$  (Véase la Fig. 11).

## Ejemplo 14

*Protección por los Péptidos D-TAT-IB Contra la Pérdida de Audición Inducida por Ruido*

Se inyectó una solución de D-JNK1 (1  $\mu$ M, 1  $\mu$ l/h) en el oído interno derecho de una cobaya tal como se muestra en la Fig. 13, panel A, mientras que se inyectó solamente una solución salina en el oído izquierdo. La cobaya se expuso entonces a un trauma acústico (120 dB, 30 minutos) y se llevó a cabo el registro de la sensibilidad de audición tres días después (Fig. 13, panel B), así como el examen histológico del oído interno (Fig. 13, panel C y D). Como se muestra en la Fig. 13, las estructuras ciliadas del oído tratado con JNK1 están totalmente protegidas contra la destrucción inducida por ruido, tal como se estima a partir del examen histológico, por contraste con el oído no tratado en el cual ha desaparecido la mayor parte de las estructuras ciliadas. Además, parece que se ha conservado la sensibilidad al ruido del oído tratado con D-JNK1 (Fig. 13, panel B).

## Ejemplo 15

*Protección por los Péptidos D-TAT-IB Contra la Pérdida de Audición Inducida por Antibióticos*

5 Se trataron los oídos internos de pollos con estreptomycin en presencia/ausencia de D-JNKI. Se realizaron entonces experimentos TUNEL para detectar la apoptosis (núcleos verdes). Como se muestra en la Fig. 14, la D-JNKI protege totalmente los oídos internos contra la apoptosis inducida por la estreptomycin. Por tanto, la D-JNK-I es útil en la prevención de estados de pérdida de audición sostenidos debidos a una terapia con antibióticos.

10

## Ejemplo 16

*Protección por los Péptidos D-TAT-IB Contra la Destrucción de Islotes Pancreáticos Inducida por Citoquinas Proinflamatorias*

15

Se trataron células de los islotes pancreáticos con D-JNK1 (1 mM durante una hora antes de su exposición a la interleuquina 1B (10 ng/ml)). Como se muestra en la Fig. 15, los islotes tratados con D-JNK1 resisten la destrucción inducida por IL-1B. Esto indica que el tratamiento con D-JNK1 ayuda a conservar los islotes injertados.

20

## Ejemplo 17

*Aumento de la Recuperación de Células de los Islotes Pancreáticos por los Péptidos D-TAT-IB*

25

Se añadió D-JNK-I junto con colagenasa durante el aislamiento de las células de los islotes. Esto resultó en una producción incrementada de islotes después de 3 días en el cultivo, tal como se mide mediante el aumento de lactato-deshidrogenasa. Véase la Fig. 15.

30

## Ejemplo 18

*Métodos Generales Utilizados para Ensayar los Efectos de los Péptidos JNKI sobre la Activación de JNK y la Acción Relacionada con JNK*

35

*Cultivo Neuronal General:* Pequeños trozos de corteza cerebral de crías de dos días de rata adulta se disecaron e incubaron con 200 unidades de papaína durante 30 minutos a 34°C. Luego, se colocaron en placas las neuronas a densidades de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/placa en cubetas que habían sido prerrecubiertas con 100 µg/ml de poli-D-lisina. Se cultivaron las células utilizando un medio de cultivo B27/Neurobasal (Life Technologies) complementado con 0,5 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

40

*Ensayo de citotoxicidad mediante lactato-deshidrogenasa (LDH):* La cantidad de LDH liberada en el medio de cultivo se midió utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactivo Cytotox 96 (Promega).

45

*Captación de GST-c-Jun y ensayo de quinasa:* Se prepararon extractos celulares mediante raspado de células en un tampón de lisis (20 mM Tris-acetato, 1 mM EGTA, Triton-X-100 al 1%, 10 mM *p*-nitrofenil-fosfato, 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM β-glicerofosfato, 1 mM ditiotretiol). Se incubaron muestras de 25 µg durante 1 hora a temperatura ambiente con 1 µg de GST-c-Jun (residuos de aminoácidos 1-89) y 10 µl de perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Se lavaron las perlas cuatro veces y se resuspendieron en el tampón de lisis descrito anteriormente. Se realizaron entonces los ensayos de quinasa *in vitro* utilizando JNK1α1 recombinante y 0,5 µg de un sustrato seleccionado de entre el grupo compuesto por proteínas de fusión con GST (por ejemplo, proteínas de fusión GST-Jun y GST-E1k1), caseína e histona (Sigma). Se iniciaron las reacciones con 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 µM ATP en presencia de 5 µCi<sup>33</sup>P-ATP, y se incubaron durante 30 minutos a 30°C. Los productos de reacción se separaron por SDS-PAGE, se secaron los geles y después se expusieron a películas de rayos X (Kodak).

50

55

*Western Blot:* Se obtuvieron extractos proteicos totales mediante raspado de células en el tampón de lisis (descrito anteriormente), separando las proteínas en un gel de poliacrilamida SDS al 12%. Las proteínas separadas se trasladaron entonces a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Los anticuerpos utilizados en el Western Blot descritos aquí se obtuvieron de Alexis.

60

*Separación de núcleos del citoplasma:* Para aislar los núcleos para el análisis Western Blot (véase la Fig. 17B), se lisaron neuronas durante 15 minutos en el tampón de lisis y después se centrifugaron las muestras a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Los gránulos nucleares se reconstituyeron en el tampón de lisis y luego se sonicaron.

65

*RT-PCR en tiempo real:* Se realizó la RT-PCR utilizando iniciadores específicos en un aparato ciclador de luz (Roche). Se utilizó la transcripción de actina como control para normalizar la cantidad y calidad de los ARN que se extrajeron por medio del método de Chomczynski. Véase Chomczynski y col., Anal. Biochem., 162:156-59 (1987). Las secuencias de los cebadores utilizados fueron como sigue:

## ES 2 319 454 T3

c-Fos: Directa: 5'-GCTGACAGATACACTCCAAG-3'

Inversa: 5'-CCTAGATGATGCCGGAACA-3'

5 Actina: Directa: 5'-AACGGCTCCGGCATGTGCAA-3'

Inversa: 5'-ATTGTAGAAGGTGTGGTGCCA-5'

10 *Inmunohistoquímica de P-c-jun*: P-c-jun, tal como se utiliza aquí, se refiere a formas fosforiladas de c-jun. Se enfocó P-c-jun con un anticuerpo policlonal de conejo (500x en PBS) (Tecnología de Señalización Celular). El complejo de anticuerpos resultante se visualizó con 3,3-diaminobenzidina como sustrato.

15 *Isquemia transitoria en ratones adultos*: En ratones machos ICR-CD1 (con una edad de aproximadamente 6 semanas y un peso en el rango de aproximadamente 18 a 37 g) (Harlan, Inc.) se provocó la isquemia mediante la introducción de un filamento desde la arteria carótida en la arteria carótida interna y haciendo avanzar el filamento en el círculo arterial, ocluyendo así la arteria cerebral media. Véase, por ejemplo, Huang y col., Science, 265:1883-85 (1994); Hara y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 94:2007-12 (1997). Se midió el flujo de sangre cerebral regional por flujometría láser-Doppler con una sonda fijada en el cráneo hasta la isquemia y hasta 10 minutos después de la reperusión. Se midió la temperatura rectal y se mantuvo a 37°C. Se sacrificaron los animales 48 horas después de la reperusión. Se cortaron series de secciones criostáticas de 20 µM de espesor utilizando un sistema de microscopio por ordenador provisto del programa Neurolucida (Microbrightfield, Inc.) y se calcularon los volúmenes de la zona isquémica y de todo el cerebro (a ciegas) con el programa Neuroexplorer. La presión sanguínea sistólica y diastólica se midió con un catéter arterial en tres ratones más desde 10 minutos antes de la inyección de D-JNKI1 hasta 30 minutos después. Estas mediciones de la presión sanguínea mostraron que las inyecciones no habían afectado a la presión sanguínea (es decir, un cambio inferior al 10%). Se siguieron en todos los experimentos las directrices de la Swiss Federal Veterinary Office.

30 *Isquemia focal permanente en ratas jóvenes (P14)*: Se obtuvo la oclusión de la arteria cerebral por electrocoagulación de la arteria cerebral media en una posición cercana a su origen en su unión con la rama olfatoria. Las ratas (Wistar), que pesaban entre aproximadamente 27 y 35 g, fueron sacrificadas 24 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media. Las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de hidrato de cloral y fueron perfundidas a través del ventrículo izquierdo con fijador de Zamboni. Los cerebros fueron postfijados durante 2 horas en la misma solución utilizada para la perfusión y luego los cerebros fueron infiltrados durante toda la noche en sacarosa al 30% para la crioprotección. Se dibujaron (colorearon) los contornos de cada zona isquémica con un sistema de microscopio por ordenador. La zona de la lesión isquémica y de todo el cerebro se dibujó a partir de series de secciones de criostato de 50 µm teñidas con violeta de cresilo utilizando el programa Neurolucida y se calcularon los volúmenes de cada una por medio del programa Neuroexplorer, tal como se ha descrito anteriormente.

40 *Estadísticas*: Los datos procedentes de ambos modelos de isquemia (es decir, transitoria y permanente) se transformaron logarítmicamente para satisfacer el criterio Gaussiano. Los datos se analizaron mediante ANOVA global ( $p < 0,0001$  para ambos modelos) seguido de ensayos-t no pareados de cola única.

### 45 Ejemplo 19

#### *Sensibilidad y Especificidad de los Péptidos JNKI con respecto a la acción de JNK*

50 Los péptidos JNKI1 utilizados en estos experimentos son destinados a bloquear el acceso de JNK a c-Jun y a otros sustratos mediante un mecanismo competitivo directo. Véase por ejemplo, Bonny y col., Diabetes, 50:77-82 (2001); Barr y col., J. Biol. Chem., 277:10987-97 (2002).

55 El efecto inhibitor de L-JNKI1 y D-JNKI1 sobre la activación y acción de JNK se sometió a prueba utilizando ensayos de quinasas, tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 18. Se muestran los resultados de estos experimentos en las Fig. 16A-16C. El efecto inhibitor de L-JNKI1 y D-JNKI1 sobre la activación y acción de JNK se muestra por su capacidad para impedir la fosforilación *in vitro* de las dianas conocidas c-Jun y Elk1 de JNK utilizando JNK1 $\alpha$ 1 (Véase la Fig. 16A). Los términos "P-Jun" y "P-Elk1" tal como se utilizan aquí se refieren a las formas radioetiquetadas (es decir, fosforiladas con <sup>33</sup>P-ATP) de los sustratos GST-Jun y GST-Elk1, respectivamente. La Fig. 16B demuestra el efecto inhibitor de la secuencia inhibitor mínima de JNK de 20 aminoácidos de JIP-IB1 (formal de JBD<sub>20</sub>) (SEQ ID NO:21)) en experimentos dosis-respuesta, utilizando condiciones similares a las utilizadas para someter a prueba el efecto de L-JNKI1 y D-JNKI1 y mediante cantidades decrecientes de L-JBD<sub>20</sub>. La Fig. 16B ilustra que el péptido L-JBD<sub>20</sub> (SEQ ID NO:21) solo (es decir, sin la secuencia TAT) puede inhibir la acción de JNK. Se demostró también que JBD<sub>20</sub> inhibía otras dianas de JNK, incluidas ATF2, IRS-1, MADD, bc1-x1. En cada uno de estos casos, la IC<sub>50</sub> fue de aproximadamente 1 µM (datos no mostrados). La secuencia TAT en estos experimentos no estaba ligada a JBD<sub>20</sub> debido a que, a una concentración superior a 50 µM, la secuencia TAT provoca una precipitación no específica de las proteínas en los extractos. Por debajo de 50 µM, TAT no influye en las propiedades inhibitoras de los péptidos JBD<sub>20</sub>.

Se realizaron experimentos *in vitro* para determinar la especificidad de los péptidos JNKI en el bloqueo de la activación de JNK. En particular, se sometió a prueba el efecto de estos péptidos sobre la actividad de 40 quinasas diferentes (10  $\mu$ M péptidos, 10  $\mu$ M ATP) hacia sus sustratos respectivos. La lista completa de los sustratos utilizados en estos experimentos se puede encontrar en <http://www.upstate.com/img/pdf/KinaseProfiler.pdf>. Tal como se esperaba, los péptidos JNKI tenían un efecto sobre las JNKs y las quinasas MKK4 y MKK7, conteniendo todos dominios de unión a JNK. Los péptidos (las formas tanto L-JNKI1 como D-JNKI1) dejaron completamente de dificultar las actividades de todas las otras quinasas. Experimentos adicionales demostraron que 500  $\mu$ M de los péptidos JBD<sub>20</sub> no dificultaron la actividad de 6 quinasas particulares: ERK2, p38, pKC, p34, caK y pKA (Fig. 16C). Los sustratos de estas quinasas son ERK2:ERK1; p38:ATF2; p34, pKC, pKA:histona y caK:caseína. Este nivel de especificidad está muy por encima de los niveles logrados con otros pequeños inhibidores químicos de la Jun-N-terminal quinasa, demostrando así la selectividad extremadamente alta de los péptidos JNKI de la invención. Para informarse sobre otros pequeños inhibidores químicos de la Jun-N-terminal quinasa (JNK), véase Bennett y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 98:13681-86 (2001).

## 15 Ejemplo 20

### *Efectos de los Péptidos JNKI sobre dianas de JNK dentro de Neuronas Corticales Tratadas con NMDA*

20 Se llevó a cabo una serie de experimentos para analizar los efectos de los péptidos JNKI de la invención sobre distintas dianas de JNK dentro de las neuronas. La activación de JNK en las neuronas corticales tratadas con N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivo se estimó mediante la realización de ensayos de quinasa sobre la JNK captada utilizando GST-c-Jun, por medio de los métodos descritos anteriormente (Véase por ejemplo, Ko y col., J. Neurochem. 71:1390-1395 (1998); Coffey y col., J. Neurosci. 20:7602-7613 (2000)). Los resultados de estos experimentos se muestran en las Fig. 17-18.

La Fig. 17A muestra la actividad de JNK en neuronas no tratadas ("0"), después de una exposición de 10 minutos a 100  $\mu$ M de NMDA (10') o después de una exposición de 30 minutos a 100  $\mu$ M de NMDA. Las dos bandas a la derecha de la Fig. 17C demuestran que la activación de JNK no cambió esencialmente por D-JNKI1. El incremento de la actividad de JNK apareció en su máximo (es decir, 2,2 veces más) después de 30 minutos del tratamiento con NMDA (Fig. 17A). Este aumento de la actividad de JNK se trasladó a una fosforilación elevada de c-Jun (Fig. 17B). La adición de los péptidos penetrantes de células L-JNKI1 y D-JNKI1 demostró impedir completamente el incremento en P-c-Jun después de 5 horas de exposición a 100  $\mu$ M de NMDA, a pesar de un nivel normal de activación de JNK. La adición de L-JNKI1 y D-JNKI1 llevó el nivel de P-c-Jun por debajo incluso del nivel de P-c-Jun en el control.

La transcripción inducida por NMDA del gen c-fos bajo la influencia de JNK a través del factor de transcripción Elk1 también fue totalmente impedida por la adición de L-JNKI1 y D-JNKI1 (Fig. 17C). La expresión de c-fos fue cuantificada por PCR en tiempo real (ciclador de luz) utilizando ARN extraído por los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 18. Los datos en la Fig. 17C se presentan como expresión de c-fos con respecto a la actina (n=4). Para una descripción de la inducción de la expresión de c-fos a través de la fosforilación de TCF/Elk-1 mediada por JNK, véase Cavigeli y col., EMBOJ., 14:5957-5964 (1995).

La duración de la neurotoxicidad y la neuroprotección de NMDA por L-JNKI1 y D-JNKI1, así como los dos péptidos de control, TAT-vacío (es decir, la secuencia TAT sola, sin la secuencia JBD<sub>20</sub>) y L-JNKI1<sub>mut</sub> (que tiene seis aminoácidos mutados en alanina, tal como se describe en Bonny y col., Diabetes 50:77-82 (2001)). Las micrografías de la Fig. 18 muestran neuronas teñidas con Hoechst 24 horas después del tratamiento. La adición de los péptidos L-JNKI1 y D-JNKI1 protegió completamente las neuronas contra los efectos excitotóxicos de NMDA (Fig. 18) o cainato (datos no mostrados), mientras que la adición de los péptidos control no tuvo ningún efecto neuroprotector. 12 horas después del tratamiento, ambos péptidos L-JNKI1 y D-JNKI1 demostraron inhibir la muerte neuronal, mientras que los péptidos TAT-vacíos no tuvieron ningún efecto (Fig. 18).

Tal como se observa en la Fig. 18, la forma D de los péptidos penetrantes en las células de la invención, es decir D-JNKI1, era superior en las neuronas protectoras durante períodos prolongados de tiempo, es decir 12 horas, 24 horas y 48 horas después de la exposición a 100  $\mu$ M de NMDA. Estas micrografías indican que 24 horas después del tratamiento, D-JNKI1 seguía proporcionando una neuroprotección total, ya que los cultivos control y los cultivos tratados con D-JNKI1 y NMDA eran comparables. La forma L de JNKI1 ya no protegía más las neuronas 24 horas después del tratamiento, supuestamente debido a que las formas L de los péptidos son generalmente más propensas a la degradación. Los péptidos TAT-vacíos no afectaron a la muerte celular en ninguna de las condiciones. El histograma de la Fig. 18 describe el nivel de muerte neuronal 12, 24 y 48 horas después de la exposición a 100  $\mu$ M de NMDA, tal como lo indica la actividad de LDH en el caldo de cultivo de la placa Petri. Los valores de absorbancia, que representan la concentración de LDH, han sido convertidos en valores porcentuales de muerte neuronal dividiendo los valores de absorbancia por la absorbancia media para un LDH total. La absorbancia media para un LDH total se obtuvo a partir del caldo de cultivo más neuronas lisadas.

65

## Ejemplo 21

*Suministro in vivo de Péptidos JNKI con permeabilidad celular*

5 Para someter a prueba la factibilidad de utilización de los péptidos con permeabilidad celular en aplicaciones *in vivo*, se evaluó su capacidad para penetrar en el cerebro utilizando L-JNKI1 y D-JNKI1 etiquetados con FITC. Para más información sobre el suministro *in vivo* de una proteína biológicamente activa en un ratón, véase Schwarze y col., Science, 285:1569-72 (1999). Estos experimentos mostraron que ambos L-JNKI1 y D-JNKI1 etiquetados con FITC eran capaces de atravesar la barrera sangre-cerebro y penetrar en las neuronas de ratones y ratas adultas de varias  
10 edades. Ambos L-JNKI1 y D-JNKI1 etiquetados con FITC eran capaces de penetrar en las neuronas tras 1 hora de su inyección intraperitoneal (datos no mostrados).

## Ejemplo 22

15 *Neuroprotección por los Péptidos JNKI contra la Isquemia Cerebral Focal Transitoria y Permanente*

En un modelo de isquemia suave en ratones, la arteria cerebral media izquierda fue ocluida durante 30 minutos, seguido de 48 horas de reperusión. El grupo control tratado con un vehículo recibió solamente una inyección de una solución de tampón fosfato (PBS). En el grupo control tratado con el vehículo, esta oclusión resultó sistemáticamente en una infartación mayor que contenía células severamente picnóticas, que se encontraban predominantemente en la corteza y el estrato en todos los cerebros, y en 7 de los cerebros, estas células se encontraban también en el hipocampo. El volumen medio infartado era de 67,4 mm<sup>3</sup> (n=12) en aquellos sujetos del grupo control tratado con  
20 vehículo.

25 Para evaluar la eficacia y la “ventana terapéutica” del tratamiento (es decir, el período de tiempo después de la lesión durante el cual el tratamiento con los péptidos de la invención sigue siendo eficaz), se trataron los sujetos con una inyección intracerebroventricular (icv) de D-JNKI1 (15,7 ng en 2 µl de PBS). La Fig. 19A muestra secciones teñidas con violeta de cresilo que representan ejemplos típicos del infarto resultante (barra, 1 mm). La Fig 19B describe los volúmenes infartados después de la inyección icv de D-JNKI1 en distintos momentos antes (-1 hora) o después (+3,6 ó 12 horas) de la oclusión de la arteria cerebral media. En la Fig. 19B, un asterisco (\*) indica que el resultado es estadísticamente distinto del control (tal como lo indica la prueba-t).

35 El pretratamiento 1 hora antes de la oclusión de la arteria cerebral media con una inyección icv de D-JNKI1 redujo el volumen de infarto medido 48 horas después de la reperusión en un 88%, hasta un volumen de 7,8 mm<sup>3</sup> (Fig. 19A-19B). La administración del péptido D-JNKI1 3 ó 6 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media seguía siendo muy protectora, ya que el volumen medio infartado en los sujetos inyectados 3 horas después de la oclusión se redujo a 5,8 mm<sup>3</sup> (una reducción del 91% en comparación con animales no tratados), y el volumen medio infartado en sujetos inyectados 6 horas después de la oclusión se redujo a 4,8 mm<sup>3</sup> (una reducción del 93% en comparación con  
40 animales no tratados). Por contraste, la inyección del péptido D-JNKI1 12 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media no fue notablemente protectora. La consecución de una isquemia completa seguida de una reperusión se confirmó en todos los animales mediante la comprobación del flujo sanguíneo cerebral regional en la zona de la arteria cerebral media izquierda.

45 Se evaluaron también las capacidades protectoras de D-JNKI1 contra la isquemia focal permanente en ratas jóvenes (P14). Se preparó una zona isquémica en la corteza cerebral de ratas P14 mediante una oclusión permanente de la arteria cerebral media, induciendo así una zona de degeneración masiva limitada a la corteza parietotemporal. Como los volúmenes del cerebro en las ratas P14 eran variables, las lesiones se expresaron como porcentaje del volumen del hemisferio cerebral. Se inyectó de forma intraperitoneal D-JNKI1 a una concentración de 11 mg/kg, lo que corresponde aproximadamente a 340 µg. Se administró D-JNKI1 30 minutos antes de la oclusión de la arteria  
50 cerebral media, o 6 ó 12 horas después de la oclusión. Las ratas se fijaron 24 horas después de la oclusión. En cada uno de estos momentos (es decir, administración a los 30 minutos, +6 horas o +12 horas), la D-JNKI1 causó reducciones mayores y estadísticamente significativas en el volumen infartado en comparación con los animales control (Fig. 20A-20B). La administración de D-JNKI1 30 minutos antes de la oclusión llevó a una reducción del volumen infartado del 68%, mientras que la administración del péptido 6 y 12 horas después de la oclusión condujo a reducciones en el  
55 volumen infartado del 78% y 49%, respectivamente.

Se realizó un análisis de inmunohistoquímica para determinar la activación del factor de transcripción de c-Jun, una diana principal de JNK, en cerebros de crías de ratas con isquemia permanente. La fosforilación de c-Jun fue  
60 evidente en muchas neuronas en la corteza peri-infartada (Fig. 5C, barra = 200 µM). Por contraste, en los cerebros tratados con el péptido D-JNKI1, la corteza peri-infartada fue negativa y se detectaron solamente unas pocas neuronas positivas en el límite de la región infartada.

65



## Ejemplo 22

*Evaluación en cuanto al Comportamiento de los Efectos Secundarios Potenciales de los Péptidos JNKI*

5 Típicamente, la alta toxicidad de otros compuestos neuroprotectores ha limitado mucho su uso clínico (Véase Gladstone y col., *Stroke*, 33:2123-36 (2002)). La capacidad de los ratones para mantenerse en giro horizontal Rotarod se utilizó como criterio para los posibles efectos secundarios de distintas dosis de D-JNKII y de una dosis terapéutica de MK-801 (1 mg/kg, dosis terapéutica estándar). En particular, la función motora de los ratones se evaluó utilizando la prueba Rotarod 3 horas, 24 horas, 6 días y 12 días después de ambas inyecciones i.p. (11 y 110 mg/kg) e icv de D-JNKII (2  $\mu$ l que contenían 15,7 ng ó 157 ng de D-JNKII). La inyección i.p. de MK-801 (1 mg/kg) se utilizó como compuesto control durante este procedimiento de evaluación.

15 Los ratones fueron adiestrados el día anterior y por la mañana del día experimental, con el fin de reducir la variabilidad entre los sujetos. Las sesiones tanto de adiestramiento como de prueba fueron idénticas para los ratones control e inyectados. La función motora de cada ratón se examinó inmediatamente antes de la inyección y 1, 6 y 12 días después de la inyección. Se colocaron los ratones en el Rotarod que estaba programado para una aceleración uniforme de 4 a 40 rpm. Se registró el estado latente de caída de cada ratón sometido a prueba. Los resultados de esta evaluación por métodos con Rotarod se presentan en la Tabla 2 como latencia mediana a la caída (medida en segundos).

TABLA 2

*Efecto de D-JNKII sobre la Coordinación Motora*

<b>Latencia Mediana a la Caída (ver)</b>						
	<b>Dosis</b>	<b>-1 hora</b>	<b>+ 3 horas</b>	<b>1 día</b>	<b>6 días</b>	<b>12 días</b>
<b>PBS</b>	2 $\mu$ l icv	234	202	238	268	246
<b>MK-801</b>	1 mg/kg i.p.	226	Incapaz	174	233	292
<b>D-JNKII</b>	11 mg/kg i.p.	204	221	372	287	418
	110 mg/kg i.p.	276	266	447	416	325
	15,7 ng icv	210	342	302	345	285
	157 ng icv	260	200	253	338	335
	2 $\mu$ l PBS icv	234	202	238	268	246

45 Como se puede observar en la Tabla 2, se descubrió que la coordinación motora estaba intacta con ambas dosis de D-JNKII por i.p. e icv (es decir, tanto la dosis de 2,8  $\mu$ l/kg, que proporcionó una neuroprotección del 90%, como la dosis 10 veces más alta). Por contraste, MK-801 condujo a un deterioro dramático de la coordinación motora, ya que los ratones eran incapaces de mantenerse en la rueda (Véase por ejemplo, Tabla 2; Dawson y col., *Brain Res.* 892:344:350 (2001) (que describen resultados similares para otros neuroprotectores), y una dosis 10 veces más alta de MK-801 mató a todos los ratones. Se descubrió que los efectos secundarios de una dosis más baja de MK-801 habían desaparecido esencialmente después de 24 horas. A los 6 y 15 días después del tratamiento con D-JNKII, no se encontró ninguna señal de deterioro motor y los resultados reproducibles en el Rotarod fueron mejores que en los ratones control.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de cualquiera de los péptidos que incluyen cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre las SEQ ID NOs: 3-6 y 22, o seleccionándose cualquiera de las secuencias de aminoácidos de entre las SEQ ID NOs: 11-16 y 23-26, o de péptidos que son homólogos en al menos un 95% a estos péptidos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un sujeto, **caracterizada** porque el péptido impide que se dañen los estereocilios de las células pilosas, la apoptosis de las células pilosas o la apoptosis neuronal.

10 2. Utilización de un ácido nucleico que codifica cualquiera de los péptidos que tienen L-aminoácidos y que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, o seleccionándose cualquiera de las secuencias de aminoácidos de entre las SEQ ID NOs: 11-13, 23 y 25, o que codifica péptidos que son homólogos en al menos un 95% a estos péptidos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un sujeto, **caracterizada** porque el péptido impide que se dañen los estereocilios de las células pilosas, la apoptosis de las células pilosas o la apoptosis neuronal.

15 3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico utilizado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición debe administrarse antes de la exposición del sujeto a un trauma acústico.

20 4. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico utilizado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición se administra después de la exposición del sujeto a un trauma acústico.

25 5. Utilización según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizada** porque el trauma acústico es un ruido de al menos 90 dB SPL.

30 6. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico utilizado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición se administra antes de la exposición del sujeto a un antibiótico.

35 7. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico utilizado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición se administra después de la exposición del sujeto a un antibiótico.

8. Utilización según la reivindicación 6 ó 7, **caracterizada** porque el antibiótico es un aminoglicósido.

40 9. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico utilizado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición se administra antes de la exposición del sujeto a un agente quimioterapéutico.

45 10. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico utilizado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición se administra después de la exposición del sujeto a un agente quimioterapéutico.

50 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, **caracterizada** porque el péptido o el ácido nucleico se administra por cualquier vía de administración seleccionada de entre el grupo consistente en la administración intraauricular, intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral y parche.

50

55

60

65



**Secuencias Genéricas, Humanas, de Ratón y de Rata**

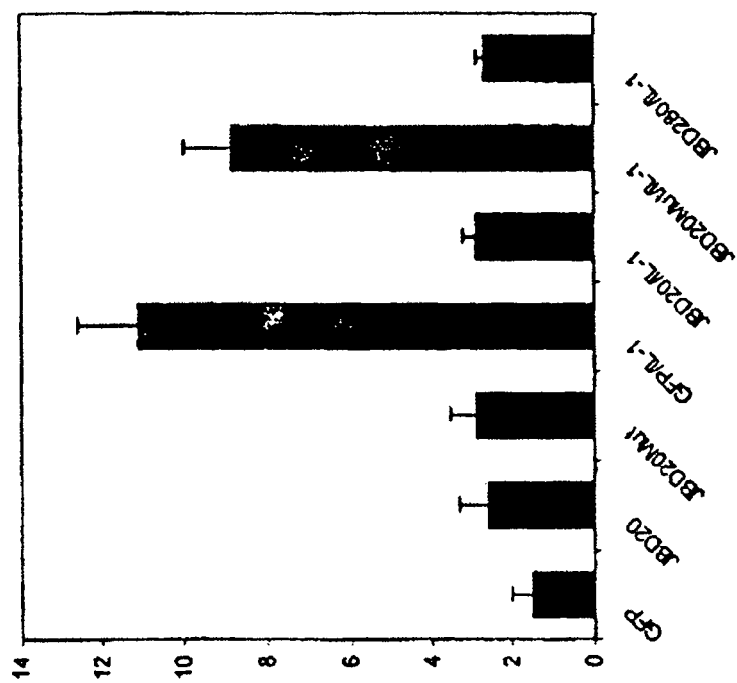
```

L-TAT-IB           : NH2- XXXXXXXXXXXRRRQRRRXXXXXXXXXXRPTTLXXXXXXXXXQDS/TX -COOH
L-TAT-JBD20       : NH2- XXXXXXXXXXXRRRQRRRXXXXXXXXXXRPTTLXXXXXXXXXQDS/TX -COOH
D-TAT              : NH2- XXXRRRQRRKKRXXX -COOH
D-TAT-IB           : NH2- XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX -COOH
D-TAT-JBD20       : NH2- XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX -COOH
    
```

**Fig. 2**

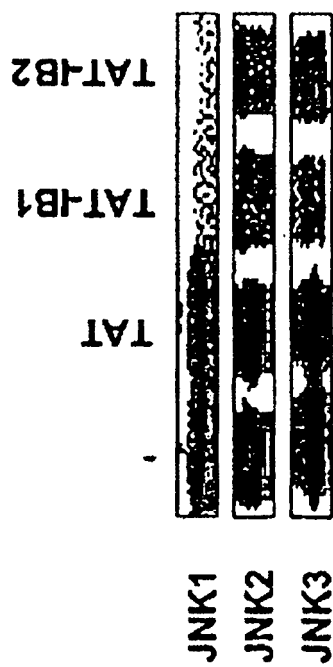
**Efectos del Constructo GFP-JBD<sub>23</sub> sobre la Apoptosis de Células-β Pancreáticas**

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)



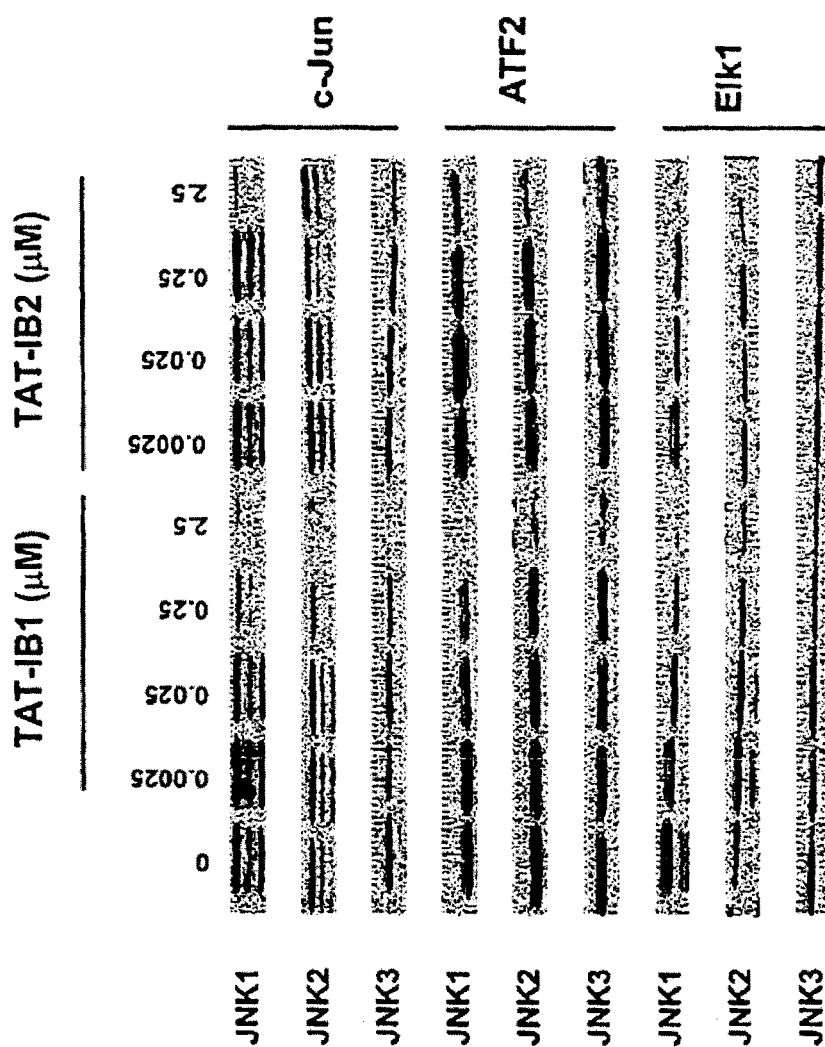
**Fig. 3**

**Efectos de los Péptidos TAT-IB sobre la Fosforilación Mediada por JNK**



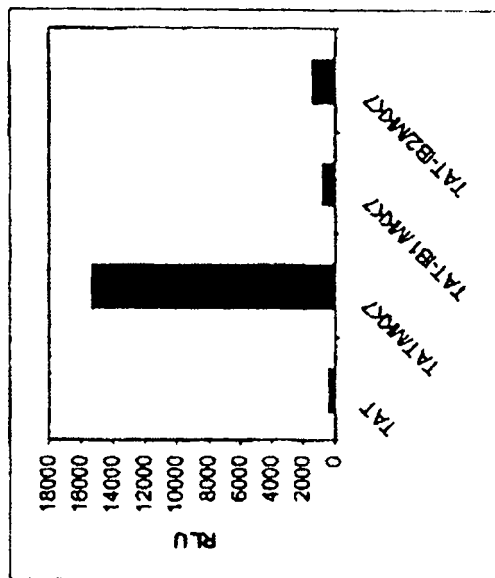
**Fig. 4a**

**Efectos de los Péptidos TAT-IB sobre la Fosforilación Mediada por JNK**

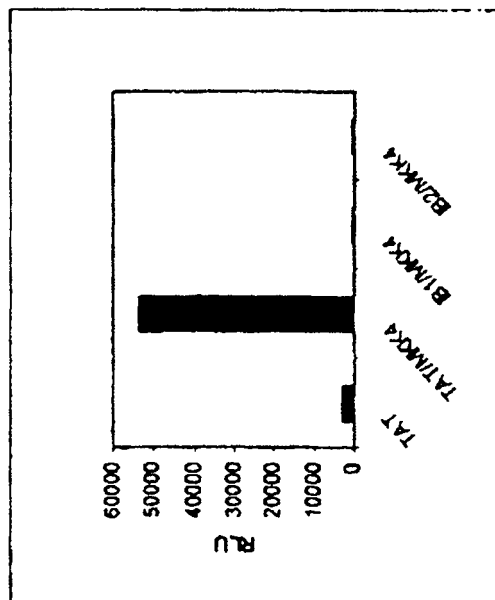


**Fig. 4b**

### Inhibición de la Fosforilación de L-TAT-IB por JNKs Recombinantes



B.



A.

Fig. 5

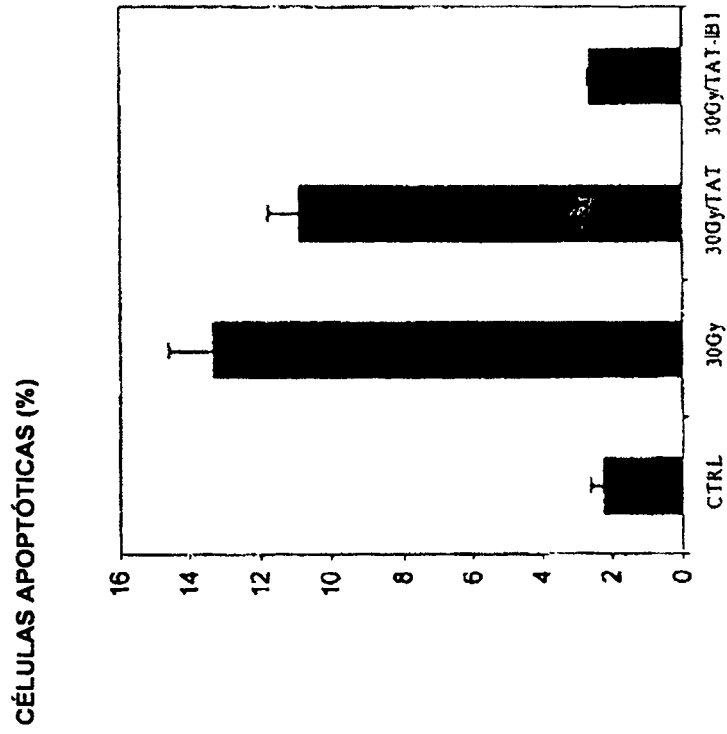


**Inhibición *In Vivo* de la Fosforilación de c-Jun por los Péptidos TAT-IB**



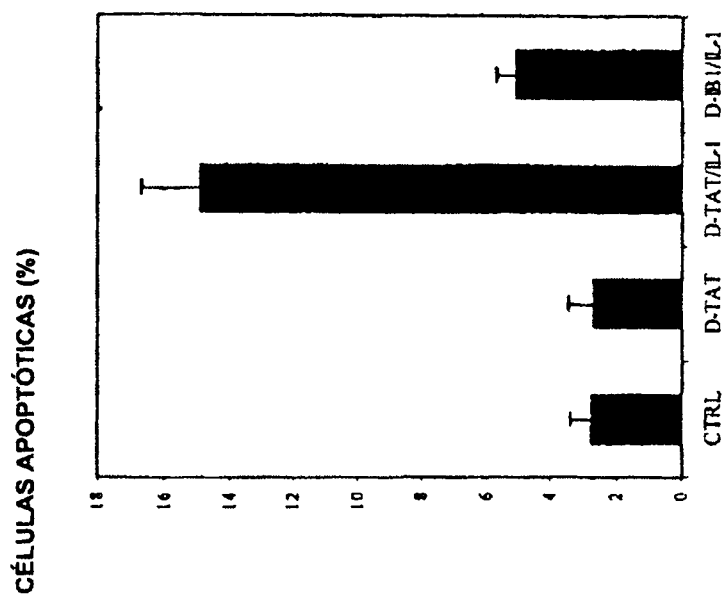
**Fig. 6**

**Inhibición por los Péptidos TAT-IB de la Muerte de Células- $\beta$   
Pancreáticas Inducida por IL-1 $\beta$**



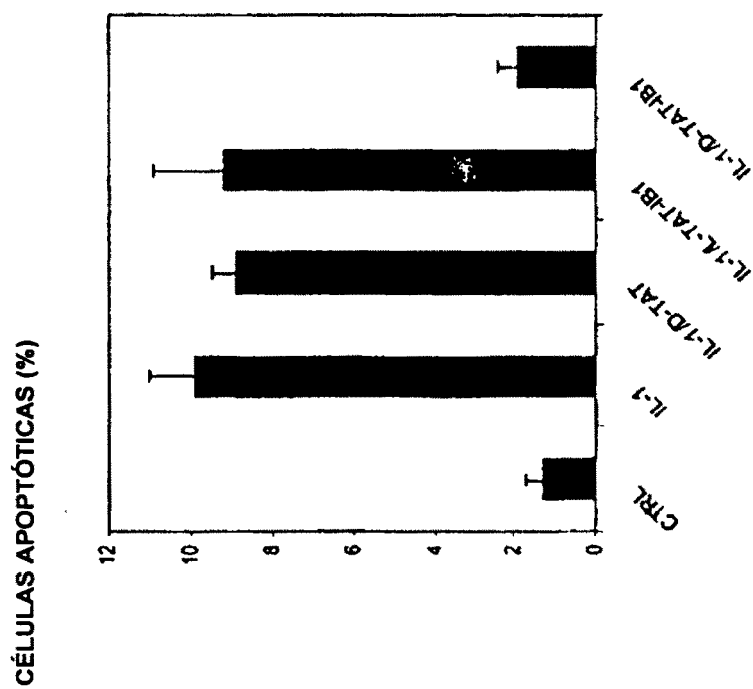
**Fig. 7**

**El péptido D-TAT-IB1 reduce la apoptosis inducida por IL-1 en las células  $\beta$ TC-3**



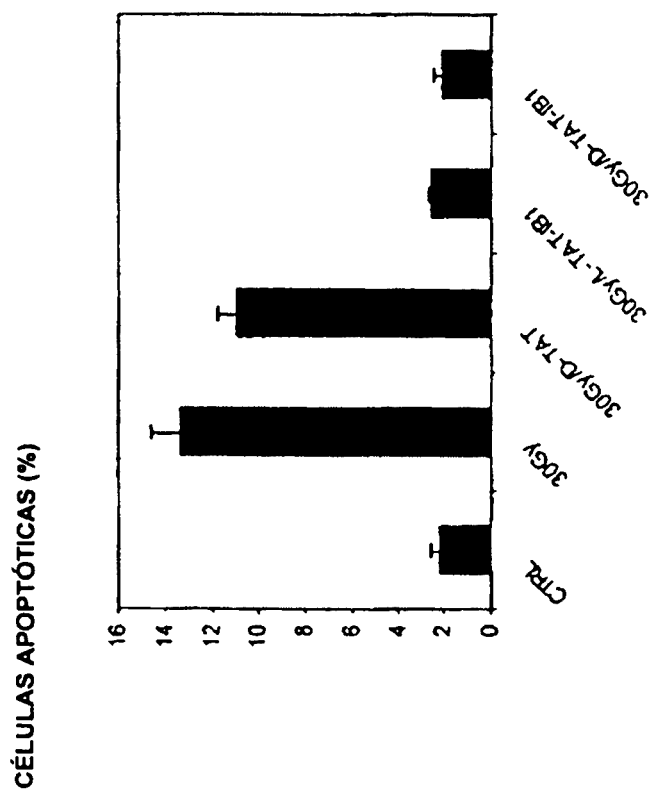
**Fig. 8**

**El péptido D-TAT-IB1 confiere protección a largo plazo (15 días) contra la apoptosis inducida por IL-1 en células  $\beta$ TC-3**



**Fig. 9**

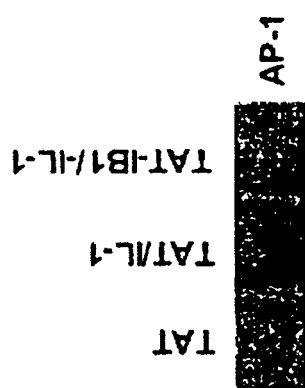
**Los péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1 impiden la apoptosis inducida por IR en una línea celular de cáncer de colón humano**



**Fig. 10**

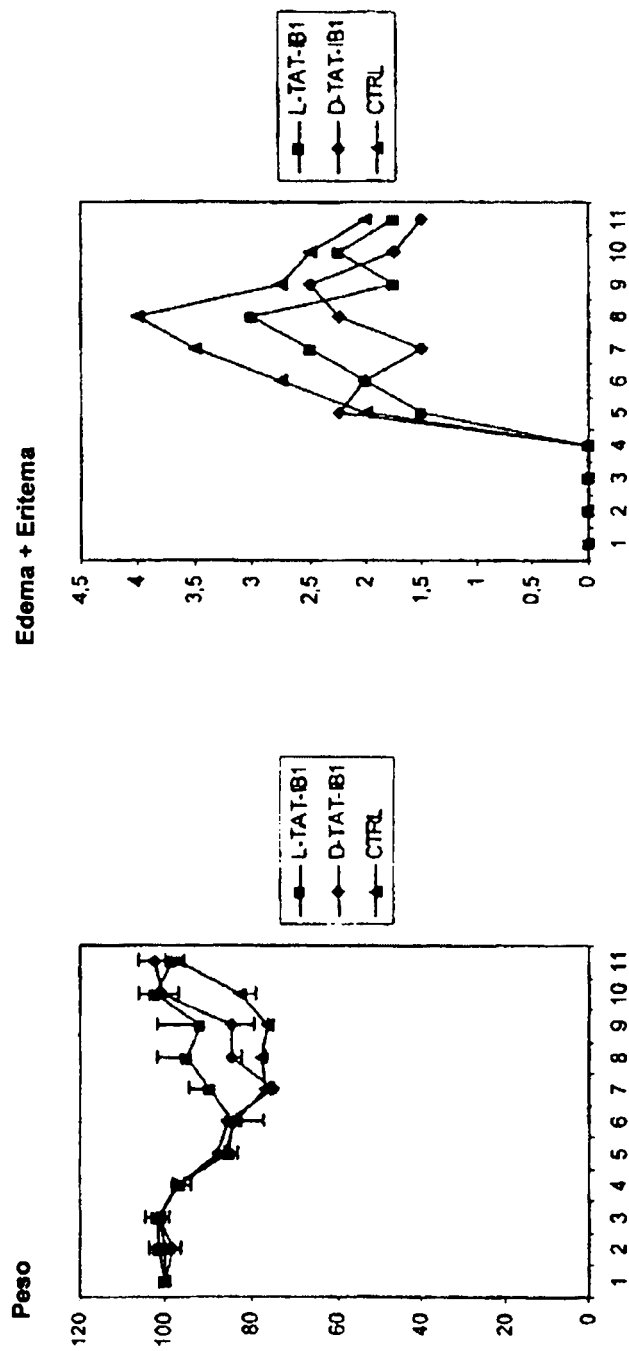
**Supresión de la Fosforilación del Factor de Transcripción JNK por los**

**Péptidos L-TAT-IB1**



**Fig. 11**

**Radioprotección contra la Radiación Ionizante por los Péptidos TAT-IB1**



A.

B.

**Fig. 12**

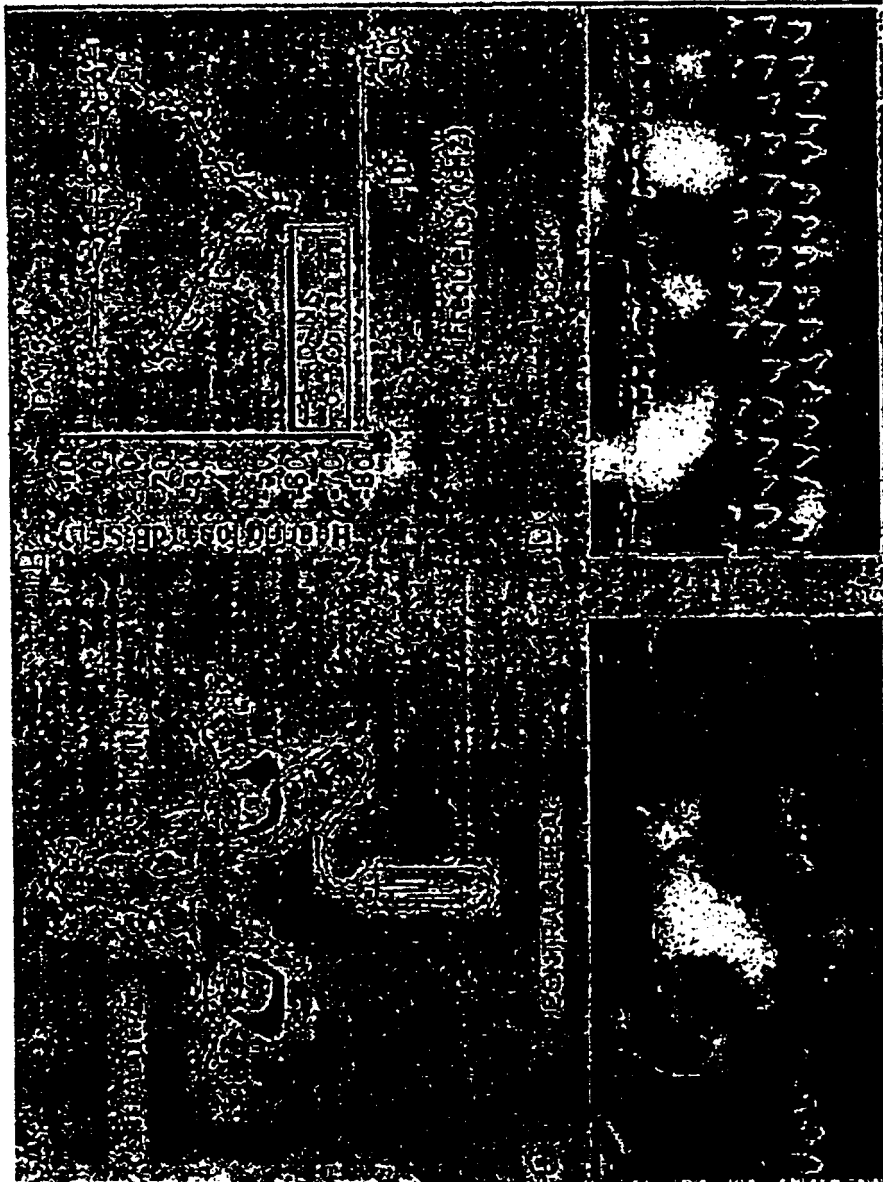


Fig. 13



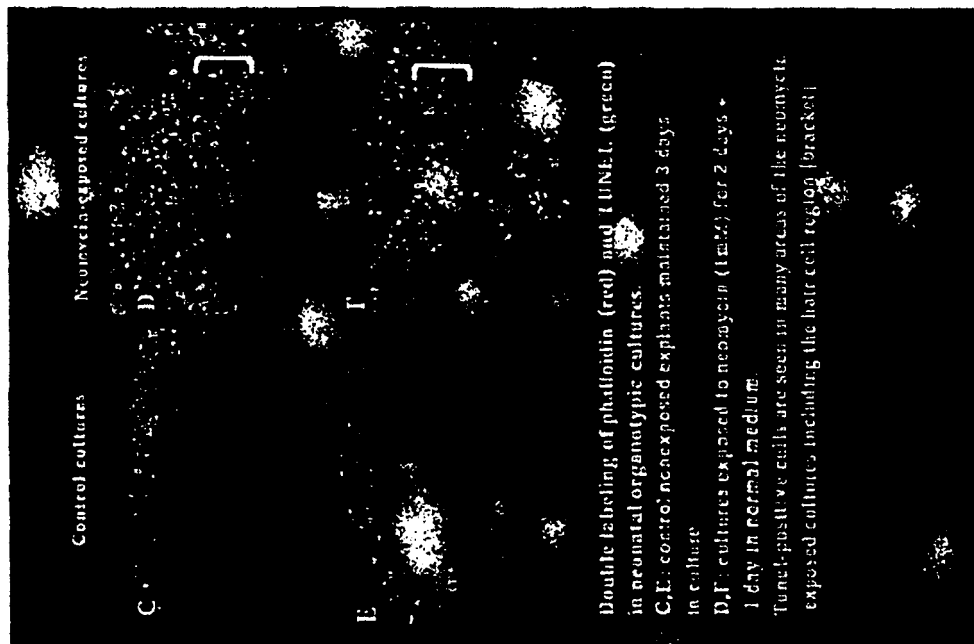


Fig. 14A

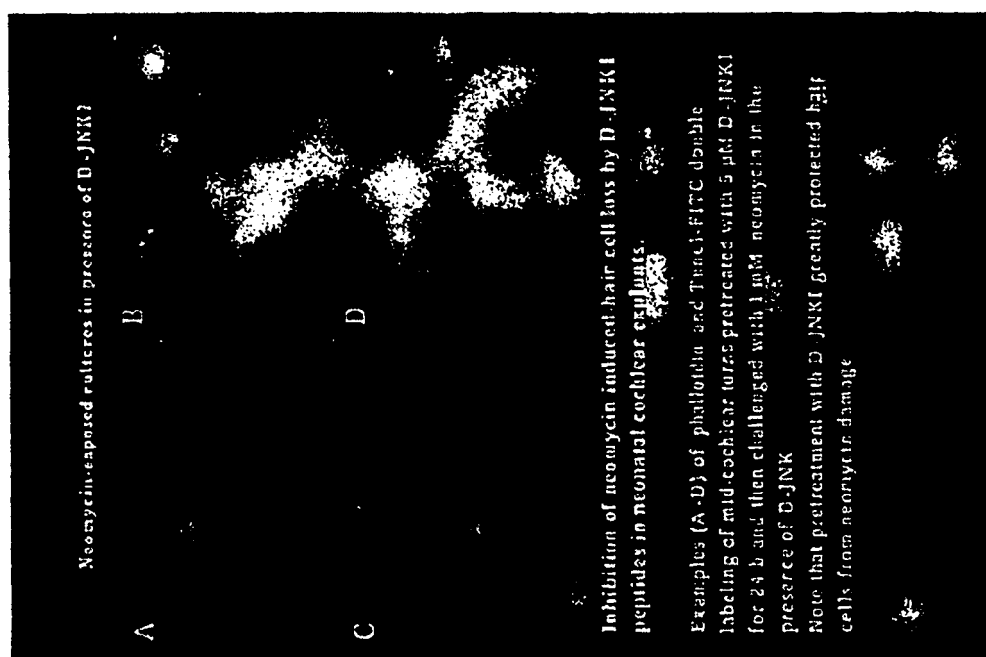


Fig. 14B

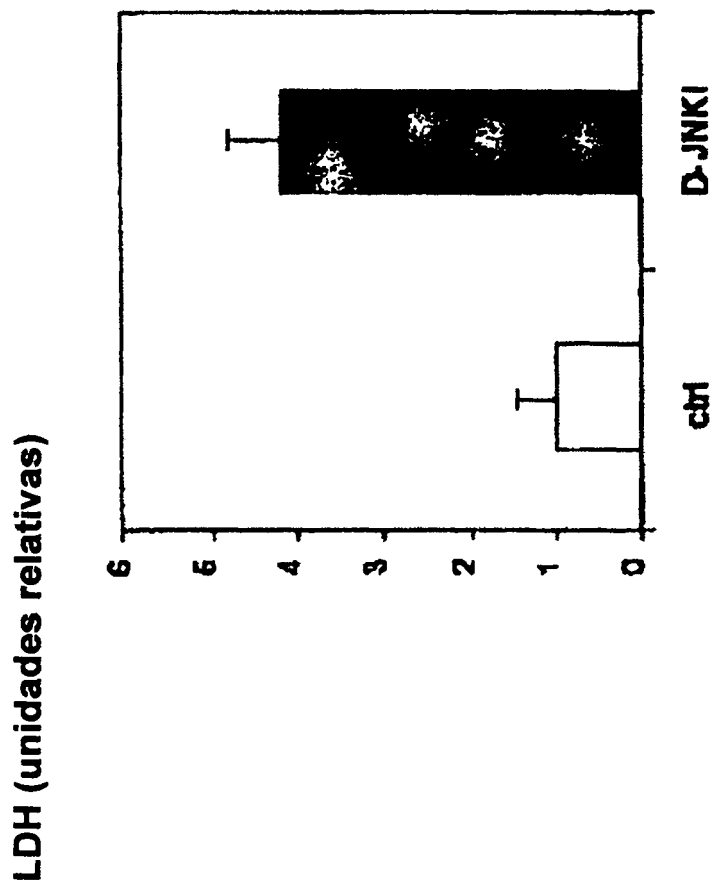


Fig. 15

FIG. 16

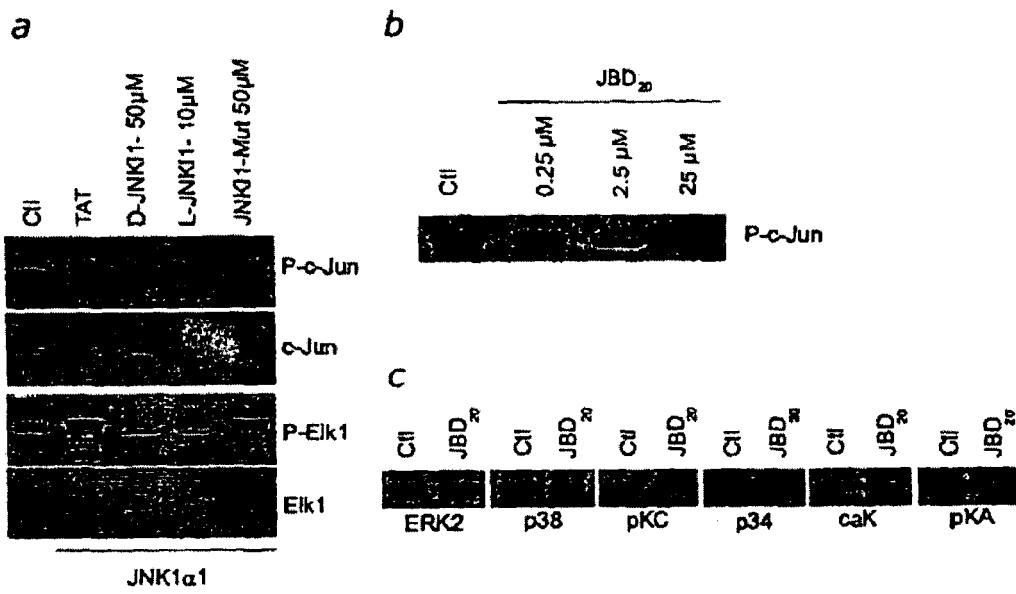


FIG. 17

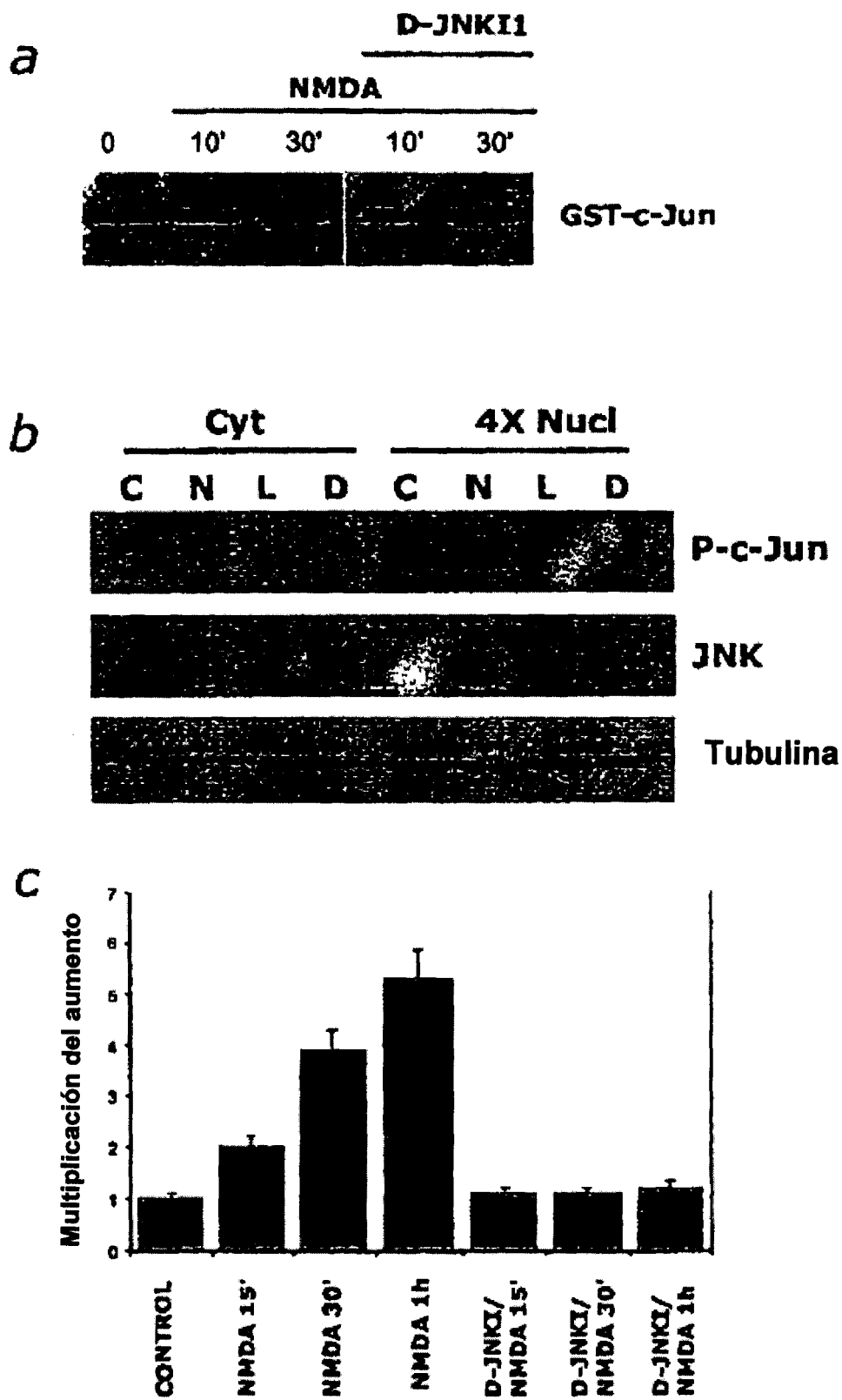


FIG. 18

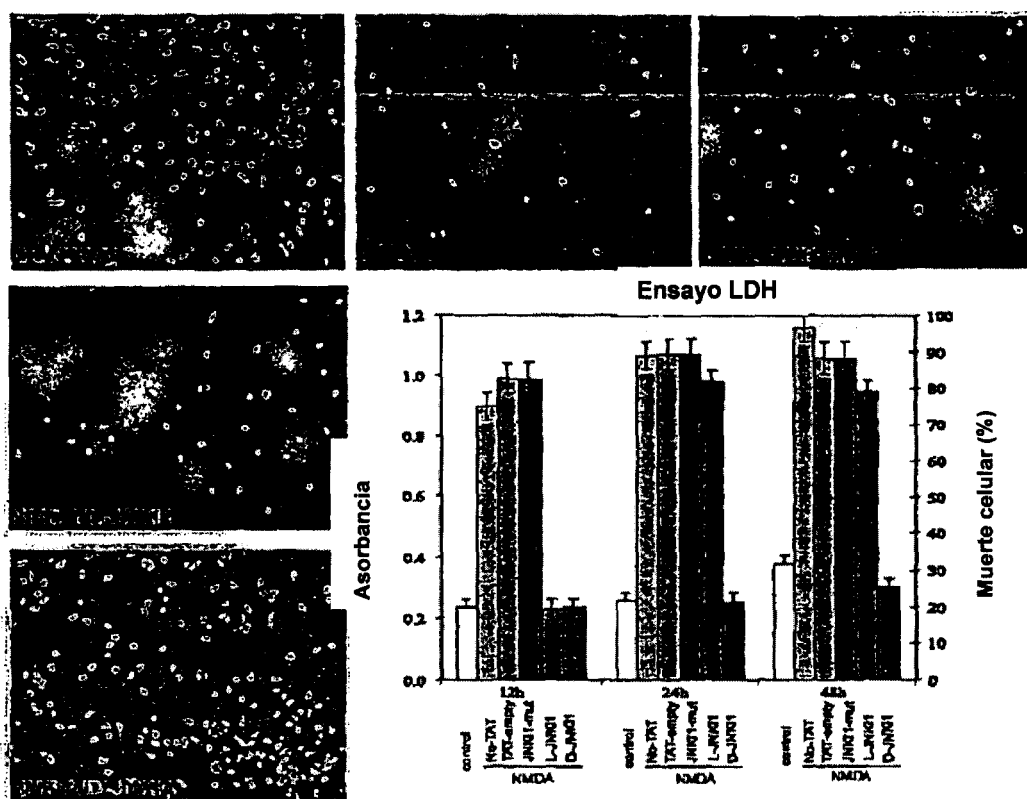


FIG. 19

*a*



*b*

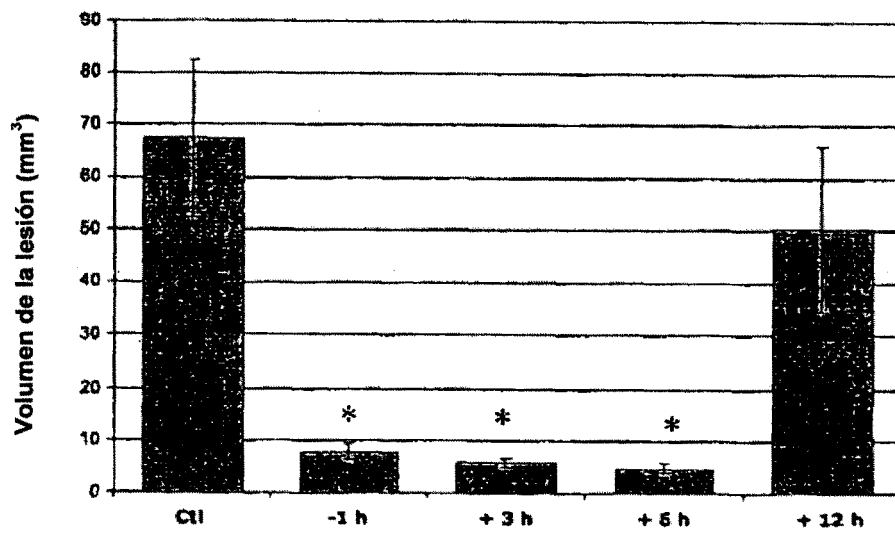
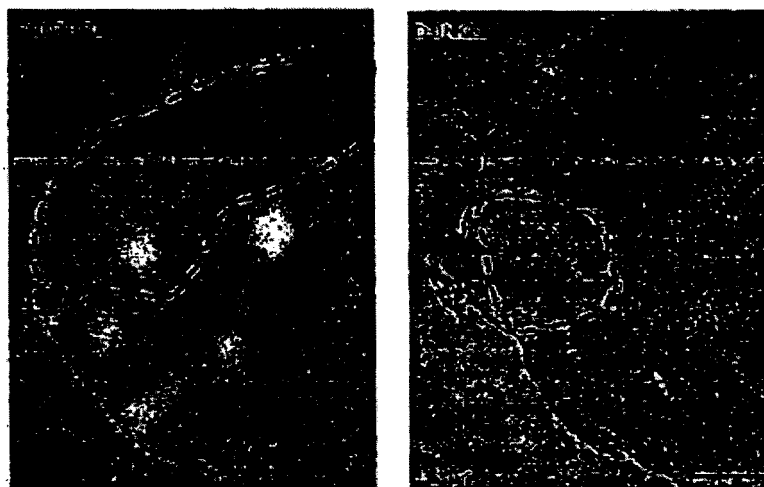
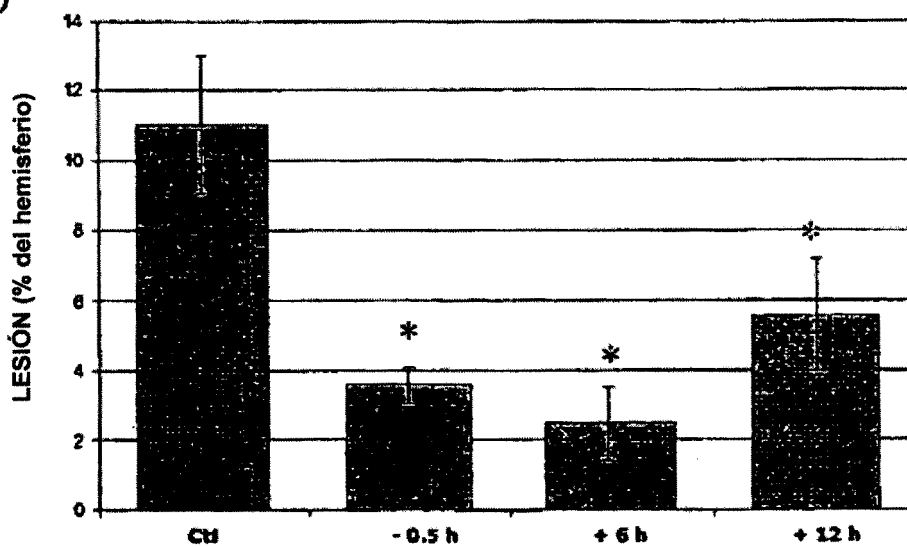


FIG. 20

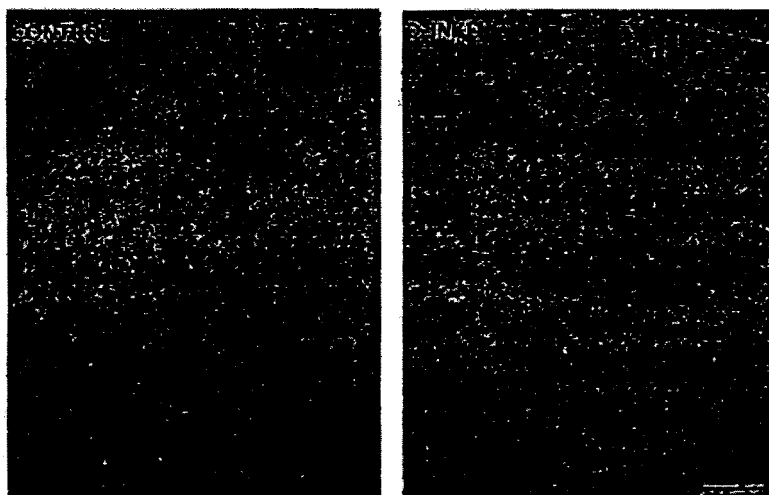
a



b



c







# ES 2 319 454 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido D-IB1 inhibidor de la JNK

5 <400> 3

**Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro**  
**1 5 10 15**

10

**Arg Lys Pro Arg Tyr Thr Asp**  
**20**

15 <210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Desconocido

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido D-IB2 inhibidor de la JNK

25 <400> 4

**Ser Asp Gln Ala Gly Leu Thr Thr Leu Arg Leu Thr Thr Pro Arg His**  
**1 5 10 15**

30

**Lys His Pro Glu Glu**  
**20**

35 <210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Desconocido

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido L-IB (genérico) inhibidor de la JNK (XRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX)

45 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (1)..(1)

50

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
55 /sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
60 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
65 /sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (7)..(7)

5 <223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 10 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 15 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 20 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

25

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (9)..(15)

30 <223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 35 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 40 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 45 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

50

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (18)..(18)

55 <223> /sustituir="Thr"

<220>

60 <221> VARIACIÓN

<222> (19)..(19)

<223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 65 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"

## ES 2 319 454 T3

/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
5 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
10 /sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

15 <400> 5

**Ala Arg Pro Thr Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln**  
**1 5 10 15**

20

**Asp Ser Ala**

25 <210> 6  
<211> 19  
<212> PRT  
30 <213> Desconocido  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia: Péptido D-IB (genérico) inhibidor de la JNK (XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX)

35 <220>  
<221> VARIACIÓN  
<222> (1)..(1)  
40 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
45 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
50 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
55 /sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

60 <220>  
<221> VARIACIÓN  
<222> (2)..(2)  
65 <223> /sustituir="Thr"  
<220>

## ES 2 319 454 T3

<221> VARIACIÓN

<222> (5)..(11)

5 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
10 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
15 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
20 /sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

<220>

25 <221> VARIACIÓN

<222> (13)..(13)

30 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
35 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
40 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
45 /sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

<220>

50 <221> VARIACIÓN

<222> (19)..(19)

55 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
60 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
65 /sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"

# ES 2 319 454 T3

/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

5

<400> 6

**Ala Ser Asp Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Thr**  
**1 5 10 15**

10

**Pro Arg Ala**

15

<210> 7

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia: Péptido que contiene la secuencia de TAT, L-TAT

<400> 7

30

**Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg**  
**1 5 10**

35 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Desconocido

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido retro-inverso que contiene la secuencia de TAT, D-TAT

45 <400> 8

**Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly**  
**1 5 10**

50

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

55

<213> Desconocido

<220>

60 <223> Descripción de la secuencia: Péptido que contiene la secuencia genérica de TAT, L-genérica-TAT

<220>

<221> VARIACIÓN

65 <222> (1)..(4)

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"

ES 2 319 454 T3

5 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 10 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 15 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

20 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (14)..(17)

25 <223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 30 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 35 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 40 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

45 <400> 9

**Ala Ala Ala Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

50

**Ala**

<210> 10

55 <211> 17

<212> PRT

<213> Desconocido

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido que contiene la secuencia genérica de TAT, D-genérica-TAT

65 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (1)..(4)

ES 2 319 454 T3

5 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
10 /sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
15 /sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

20 <220>  
<221> VARIACIÓN  
25 <222> (14)..(17)

30 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
35 /sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
40 /sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

45 <400> 10

50 **Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

**Ala**

55 <210> 11  
<211> 35  
<212> PRT

60 <213> Desconocido

<220>  
<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, L-TAT-IB1

65



ES 2 319 454 T3

<400> 11

5 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Asp Thr Tyr Arg  
1 5 10 15  
10 Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser  
20 25 30  
15 Gln Asp Thr  
35

15 <210> 12

<211> 33

<212> PRT

20 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, L-TAT-IB2

25 <400> 12

30 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Glu Glu Pro His  
1 5 10 15  
35 Lys His Arg Pro Thr Thr Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp  
20 25 30  
40 Ser

<210> 13

40 <211> 42

<212> PRT

<213> Desconocido

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, L-TAT-IB (genérica) (XXXXXXXXRKK  
RRQRXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXX-QDS/TX)

50 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (1)..(7)

55 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
60 /sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
65 /sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"

/sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

5

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (17)..(24)

10

<223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

15

20

25

30

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (30)..(30)

35

<223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

40

45

50

55

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (32)..(38)

60

<223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"

65

ES 2 319 454 T3

/sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 5 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 10 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

<220>

15 <221> VARIACIÓN  
 <222> (41)..(41)  
 <223> /sustituir="Thr"

20 <220>  
 <221> VARIACIÓN  
 <222> (42)..(42)  
 25 <223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 30 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 35 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 40 /sustituir="Tyr"  
 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

45 <400> 13

**Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg**  
**1 5 10 15**

50

**Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Pro Thr Thr Leu Ala Leu Ala**  
**20 25 30**

55

**Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Asp Ser Ala**  
**35 40**

<210> 14  
 <211> 35  
 60 <212> PRT  
 <213> Desconocido

65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, D-TAT-IB1

ES 2 319 454 T3

<400> 14

Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro  
1 5 10 15

5

Arg Lys Pro Arg Tyr Thr Asp Pro Pro Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys  
20 25 30

10

Lys Arg Gly  
35

<210> 15

15 <211> 33

<212> PRT

<213> Desconocido

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, D-TAT-IB2

<400> 15

25

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

30

Lys His Pro Glu Glu Pro Pro Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg  
20 25 30

35

Gly

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

40 <213> Desconocido

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, D-TAT-IB (genérica) (XT/SDQXXXXX  
XXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX)

<220>

<221> VARIACIÓN

50 <222> (1)..(1)

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
55 /sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
60 /sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
65 /sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"

## ES 2 319 454 T3

/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

5 <220>  
<221> VARIACIÓN  
<222> (2)..(2)  
10 <223> /sustituir="Ser"

<220>  
<221> VARIACIÓN  
15 <222> (5)..(11)  
<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
20 /sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
25 /sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
30 /sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
35 /sustituir=""

<220>  
<221> VARIACIÓN  
40 <222> (13)..(13)  
<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
45 /sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
50 /sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
55 /sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
60 /sustituir=""

<220>  
<221> VARIACIÓN  
65 <222> (19)..(26)  
<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"

ES 2 319 454 T3

5 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 10 /sustituir="Phe"  
 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 15 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

20 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (36)..(92)

25 <223> /sustituir="Arg"  
 /sustituir="Asx"  
 /sustituir="Cys"  
 /sustituir="Glx"  
 /sustituir="Gly"  
 /sustituir="His"  
 30 /sustituir="Ile"  
 /sustituir="Leu"  
 /sustituir="Lys"  
 /sustituir="Met"  
 /sustituir="Phe"  
 35 /sustituir="Pro"  
 /sustituir="Ser"  
 /sustituir="Thr"  
 /sustituir="Trp"  
 /sustituir="Tyr"  
 40 /sustituir="Val"  
 /sustituir="Xaa"  
 /sustituir=""

45 <400> 16

**Ala Thr Asp Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Thr**  
**1 5 10 15**

**Pro Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Gln Arg Arg**  
**20 25 30**

**Lys Lys Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**35 40**

60 <210> 17

<211> 29

<212> PRT

<213> Desconocido

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia: JBD de IB1, IB1-largo

ES 2 319 454 T3

<400> 17

Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr  
 1 5 10 15

5

Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr  
 20 25

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Desconocido

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia: JBD de IB2, IB2-largo

20 <400> 18

Ile Pro Ser Pro Ser Val Glu Glu Pro His Lys His Arg Pro Thr Thr  
 1 5 10 15

25

Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp Ser  
 20 25

<210> 19

30 <211> 29

<212> PRT

<213> Desconocido

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia: JBD de c-Jun, c-Jun

<400> 19

40

Gly Ala Tyr Gly Tyr Ser Asn Pro Lys Ile Leu Lys Gln Ser Met Thr  
 1 5 10 15

45

Leu Asn Leu Ala Asp Pro Val Gly Asn Leu Lys Pro His  
 20 25

<210> 20

<211> 29

50

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

55

<223> Descripción de la secuencia: JBD de ATF2, ATF2

<400> 20

60

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

65

Leu Lys Phe Gly Pro Ala Arg Asn Asp Ser Val Ile Val  
 20 25

## ES 2 319 454 T3

<210> 21  
<211> 20  
<212> PRT  
5 <213> Desconocido

<220>  
<223> Descripción de la secuencia: Péptido inhibidor de JNK, L-JBD20  
10  
<400> 21

15           **Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg**  
          1                               5                               10                               15

**Ser Gln Asp Thr**  
  20

20  
<210> 22  
<211> 20  
<212> PRT  
25 <213> Desconocido

<220>  
30 <223> Descripción de la secuencia: Péptido inhibidor de JNK, D-JBD20

<400> 22

35           **Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro**  
          1                               5                               10                               15

**Arg Lys Pro Arg**  
  20

40  
<210> 23  
<211> 32  
45 <212> PRT  
<213> Desconocido

<220>  
50 <223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, L-TAT-JNKII1 (es decir, L-TAT-JBD20)

<400> 23

55           **Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Arg Pro Lys Arg**  
          1                               5                               10                               15

60           **Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr**  
  20                               25                               30

<210> 24  
<211> 32  
65 <212> PRT  
<213> Desconocido



## ES 2 319 454 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, D-TAT-JNKI1 (es decir, D-TAT-JBD20)

5 <400> 24

**Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro**  
**1 5 10 15**

10

**Arg Lys Pro Arg Pro Pro Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly**  
**20 25 30**

15

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

20 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, L-TAT-JNKI1 (genérica) (XXXXRKK  
RRQRRRXXXXRPTTLXLXXXXXXXXXQDS/T)

25

<220>

<221> VARIACIÓN

30 <222> (1)..(4)

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

50

<220>

<221> VARIACIÓN

55 <222> (14)..(17)

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"

65

## ES 2 319 454 T3

5 /sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

10 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (23)..(23)

15 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
20 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
25 /sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
30 /sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

35 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (25)..(31)

40 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
45 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
50 /sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
55 /sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

60 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (39)..(39)

<223> /sustituir="Thr"

65

# ES 2 319 454 T3

<400> 25

5           Ala Ala Ala Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ala Ala  
          1                           5                           10                           15

10           Ala Arg Pro Thr Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln  
                          20                           25                           30

**Asp Ser**

15 <210> 26

<211> 34

<212> PRT

<213> Desconocido

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Proteína de fusión inhibidora de JNK, D-TAT-JNKII (genérica) (S/TDQXXXXX  
XXLXLTPRXXXXRRRQRRKKRXXXX)

25

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (1)..(1)

30

<223> /sustituir="Thr"

<220>

35

<221> VARIACIÓN

<222> (4)..(10)

40

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

55

<220>

60

<221> VARIACIÓN

<222> (12)..(12)

65

<223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
/sustituir="His"

## ES 2 319 454 T3

5 /sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
/sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
10 /sustituir="Trp"  
/sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

15 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (18)..(21)

20 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
25 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
30 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
35 /sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

40 <220>

<221> VARIACIÓN

<222> (31)..(39)

45 <223> /sustituir="Arg"  
/sustituir="Asx"  
/sustituir="Cys"  
/sustituir="Glx"  
/sustituir="Gly"  
50 /sustituir="His"  
/sustituir="Ile"  
/sustituir="Leu"  
/sustituir="Lys"  
/sustituir="Met"  
55 /sustituir="Phe"  
/sustituir="Pro"  
/sustituir="Ser"  
/sustituir="Thr"  
/sustituir="Trp"  
60 /sustituir="Tyr"  
/sustituir="Val"  
/sustituir="Xaa"  
/sustituir=""

65

# ES 2 319 454 T3

<400> 26

5           **Ser Asp Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Thr Pro**  
          1                           5                           10                           15

10           **Arg Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Ala Ala**  
                          20                           25                           30

15           **Ala Ala**

<210> 27

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Desconocido

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido inhibidor de JNK, L-JBD20-mut

<400> 27

25           **Arg Pro Lys Arg Pro Thr Ala Ala Asn Ala Phe Pro Gln Val Pro Arg**  
          1                           5                           10                           15

30           **Ser Gln Asp Thr**  
                          20

<210> 28

35 <211> 20

<212> PRT

<213> Desconocido

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Péptido inhibidor de JNK, D-JBD20-mut

<400> 28

45           **Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Ala Pro Phe Ala Asn Ala Ala Thr Pro**  
          1                           5                           10                           15

50           **Arg Lys Pro Arg**  
                          20

<210> 29

55 <211> 21

<212> ADN

<213> Desconocido

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Sonda de doble marcado de AP-1 (véase página 45 de la descripción)

<400> 29

65           cgcttgatga gtcagccgga a

## ES 2 319 454 T3

	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Desconocido	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia: Iniciador “directo” c-Fos por RT-PCR (véase página 48 de la descripción)	
	<400> 30	
	gctgacagat acactccaag	20
15	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Desconocido	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia: Icebador “inverso” c-Fos por RT-PCR (véase página 48 de la descripción)	
	<400> 31	
	cctagatgat gccggaaca	20
30	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Desconocido	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia: cebador “directo” actina por RT-PCR (véase página 48 de la descripción)	
	<400> 32	
	aacggctccg gcatgtgcaa	20
45	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Desconocido	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia: cebador “inverso” actina por RT-PCR (véase página 48 de la descripción)	
	<400> 33	
60	attgtagaag ggtggtgcc a	21
65		