

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 660**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06822433 .6**

96 Fecha de presentación: **27.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1950294**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Nuevo péptido que penetra en las células**

30 Prioridad:
28.10.2005 JP 2005314355

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2012

73 Titular/es:
**Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation
2-6-18, Kitahama, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8505, JP**

72 Inventor/es:
**UNO, Shusei;
KAMIDE, Kaeko y
NAKAKUBO, Hiroshi**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 377 660 T3

DESCRIPCIÓN

Nuevo péptido que penetra en las células.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo péptido que penetra en las células y a un producto farmacéutico que contiene al péptido.

Antecedentes de la invención

Los ácidos nucleicos, en su uso terapéutico o diagnóstico, no penetran por la membrana celular, a diferencia de las proteínas normales, aunque recientemente se ha encontrado que hay péptidos que transportan proteínas y ácidos nucleicos dentro de las células y núcleos en los organismos vivos (denominados de aquí en adelante en este documento "Proteínas TAT") (del documento no de patente 1 al documento no de patente 3). Además, se ha encontrado que una proteína de fusión de un péptido que consiste en 11 aminoácidos particulares de las proteínas TAT con otra proteína penetra por la membrana celular; a dichas regiones, esenciales para el traspaso de la membrana celular, es decir, los péptidos que penetran en las células, se las denominan PTD (Protein Transduction Domains) (documento no de patente 4).

Hasta ahora, se han desarrollado métodos para transportar proteínas y ácidos nucleicos dentro de las células por medio de varios péptidos que penetran en las células. Específicamente, se ha propuesto un método que utiliza un polipéptido parcial particular de la proteína TAT del VIH-1 (documento de patente 1).

Aunque existen péptidos naturales que penetran en las células que se usan convencionalmente, se plantea el problema de su baja eficacia de desplazamiento. Por esta razón, ha habido una demanda en el desarrollo de péptidos con una alta eficacia en el transporte.

Documento de patente 1: JP-A-HEI-10-33186

Documento de no patente 1: Green, M. *et al. Cell* **55**, 1179-1188 (1988)

Documento de no patente 2: Frankel, A.D. *et al. Cell* **55**, 1189-1193 (1988)

Documento de no patente 3: Fawell, S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 664-668 (1994)

Documento no de patente 4: Nagahra, H. *et al. Nature Medicine* **4**, 1449-1452 (1998)

La publicación de Golovkina *et al.*, *Journal of Virology*, volumen **72**, pps 3066-3071 (1998) describe un receptor de proteína de membrana para la unión del virus del tumor mamario de ratón (MMTV). La secuencia de la proteína del receptor de MMTV, según se representa en la Fig. 3, muestra en un solapamiento parcial la siguiente secuencia: RELERVYSQRSR. La publicación de Kokura *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, volumen **278**, pps 20133-20139 (2003) describe un "proteína de unión de Ski C184M" intracelular (citósólica). La misma secuencia de solapamiento que se menciona con relación a la publicación de Golovkina, también aparece en la secuencia de C184M según se representa en la Fig. 1. Además, la publicación de Royo *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, volumen **271**, pps 21021-21019 (1996) muestra secuencias de aminoácidos de la lipoxigenasa de patata (véase la Fig. 1).

Descripción de la invención*Problemas que soluciona la invención*

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo péptido que penetra en las células y un producto farmacéutico que contiene al péptido.

Medios para solucionar los problemas

La presente invención proporciona un polipéptido como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3. La presente invención proporciona además un ADN que consiste en las secuencias de ADN que codifican a dicho péptido, un vector recombinante que contiene dicho ADN, y un transformante que comprende dicho vector recombinante. La presente invención proporciona además una sustancia ligada al péptido como se expone en la reivindicación 7. Las realizaciones preferidas de la sustancia ligada al péptido son expuestas en las sub-reivindicaciones. La presente invención proporciona además un producto farmacéutico que contiene dicha sustancia ligada al péptido, que se usa preferentemente como fármaco antialérgico.

Los presentes inventores investigaron diligentemente para proporcionar un péptido que consistía en una nueva secuencia de aminoácidos, útil como péptido de penetración en la célula, identificaron la secuencia de aminoácidos del péptido que transporta proteínas en las células a una frecuencia más alta que los péptidos que penetran en las células convencionales y desarrollaron la presente invención. Específicamente, los presentes inventores

descubrieron un péptido con una transferibilidad intracelular alta, en una biblioteca de péptidos aleatoria de 10^{12} moléculas por cribado completo. Se piensa que los péptidos seleccionados utilizando esta técnica son particularmente muy transferibles entre los péptidos con capacidad de desplazamiento intracelular.

En consecuencia, la presente invención es como sigue:

- 5 (1) Un péptido (I) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada más abajo:

**B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X or X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-
Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B**

en donde (i) B es arginina o lisina, (ii) al menos uno de O¹ u O² es arginina, (iii) Z es un aminoácido hidrófobo, (iv) J es serina o alanina, y (v) X es un aminoácido elegido aleatoriamente;

- 10 o (II) que tiene un aminoácido o varios aminoácidos elegidos aleatoriamente en el extremo C-terminal y/o extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos definida en (I), a condición de que sea capaz de transportar proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos.

(2) El péptido según (1), que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de SEQ ID NOS:1 a 34 en el listado de secuencias en donde un aminoácido o varios aminoácidos han sido sustituidos, delecionados, añadidos o insertados.

- 15 (3) Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias en donde uno o dos aminoácidos han sido sustituidos, delecionados, añadidos o insertados, y su péptido de cadena invertida, teniendo el péptido la capacidad de desplazarse en las células.

(4) Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias, y su péptido de cadena invertida.

- 20 (5) Un ADN que consiste en la secuencia de ADN que codifica el péptido según cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores.

(6) Un vector recombinante que contiene el ADN según el punto (5) anterior.

(7) Un transformante que comprende el vector recombinante según el punto (6) anterior.

- 25 (8) Una sustancia ligada al péptido incluyendo el péptido según cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores y, unido a esto, una sustancia bioactiva.

(9) La sustancia ligada al péptido según el punto (8) anterior, en donde la sustancia bioactiva es una proteína que tiene actividad biológica, un polipéptido que tiene actividad biológica, un liposoma que encapsula a un fármaco, un liposoma que encapsula a un fármaco polietilenglicolado, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico, una perla magnética, una nanopartícula o un fago.

- 30 (10) La sustancia ligada al péptido según el punto (8) anterior, en donde la proteína que tiene actividad biológica es una proteína que tiene de aproximadamente 10 KDa a aproximadamente 120 KDa o de 4 a 30 polipéptidos.

(11) La sustancia ligada al péptido según el punto (8) anterior, en donde la proteína que tiene actividad biológica es el factor de transcripción MI (MITF).

- 35 (12) La sustancia ligada al péptido según cualquiera de los puntos de (8) a (11) anteriores, que es transportada dentro de las células y/o de los núcleos.

(13) La sustancia ligada al péptido según cualquiera de los puntos de (8) a (11) anteriores, que es transportada dentro de las células.

(14) Un producto farmacéutico que contiene la sustancia ligada al péptido según el punto (8) anterior.

(15) El producto farmacéutico según el punto (14) anterior, que se usa como fármaco antialérgico.

- 40 *Efecto de la Invención*

Según la presente invención, es posible proporcionar un péptido que penetre dentro de la célula transportando proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos con una frecuencia más alta que los péptidos que penetran en las células convencionales y un producto farmacéutico que contiene el péptido.

Breve Descripción de los Dibujos

- Fig.1. Una representación que muestra los resultados de una prueba de desplazamiento intracelular de un péptido marcado con fluorescencia. Los paneles superiores muestran la fluorescencia de FITC; los paneles inferiores muestran las imágenes microscópicas de interferencia diferencial de células en combinación con imágenes fluorescentes.
- Fig. 2. Una representación que muestra los resultados de una prueba de desplazamiento intracelular de un péptido marcado con fluorescencia usando el sistema Chamber SlideTM. Los paneles superiores de fotografías muestran la fluorescencia de FITC; los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas de interferencia diferencial de células en combinación con imágenes fluorescentes.
- Fig. 3. Una representación que muestra los resultados de análisis por citometría de flujo.
- Fig. 4. Una representación que muestra los resultados de pruebas de desplazamiento intracelular de proteínas de fusión eGFP usando un microscopio confocal.
- Fig. 5. Una representación que muestra las estructuras de rueda de los péptidos KSH1 y KSH1-1 a 1-9. En los dibujos de más abajo, las abreviaturas para los aminoácidos usados en las estructuras de rueda son definidas como sigue: A: alanina, V: valina, L: leucina, I: isoleucina, P: prolina, F: fenilalanina, W: triptófano, M: metionina, G: glicina, S: serina, T: treonina, C: cisteína, Y: tirosina, N: asparagina, Q: glutamina, E: ácido glutámico, K: lisina, R: arginina, H: histidina, D: ácido aspártico.
- Fig. 6. Una representación que muestra los resultados de análisis de los péptidos marcados con fluorescencia KSH1 y KSH1-1 a 1-9 en células CHO por citometría de flujo (FACS).
- Fig. 7. Una representación que muestra las estructuras de rueda de los péptidos KSH1-11 a 1-24 y KSH1-35.
- Fig. 8. Una representación que muestra los resultados de análisis de los péptidos marcados con fluorescencia KSH1-11 a 1-24 y KSH1-35 en células CHO por citometría de flujo.
- Fig. 9. Una representación que muestra las estructuras de rueda de los péptidos KSH1-24 a 1-26 y KSH1-28 a 1-30.
- Fig. 10. Una representación que muestra los resultados de análisis de los péptidos marcados con fluorescencia KSH1-1, KSH1-24 a 1-26 y KSH1-28 a 1-30 en células CHO por citometría de flujo.
- Fig. 11. Una representación que muestra las estructuras de rueda de los péptidos KSH1-27, KSH1-33, KSH1-34 y KSH1-36.
- Fig. 12. Una representación que muestra los resultados de análisis de péptidos marcados con fluorescencia de KSH1-27, KSH1-33, KSH1-34 y KSH1-36 en células CHO por citometría de flujo.
- Fig. 13. Una representación que muestra la estructura de rueda de un péptido de una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de los resultados de una investigación de modificación del péptido KSH1.
- Fig. 14. Una representación que muestra el constructo de la expresión de proteínas de fusión eGFP.
- Fig. 15. Mapas del vector de las proteínas de fusión eGFP.
- Fig. 16. Una representación que muestra cómo insertar oligos sintético dentro de un vector. Este dibujo es para un vector tipo D.
- Fig. 17. Una representación que muestra los resultados de pruebas de desplazamiento intracelular de proteínas de fusión eGFP usando un microscopio confocal. Los paneles superiores muestran la fluorescencia de FITC; los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas de interferencia diferencial de células junto con imágenes fluorescentes.
- Fig. 18. Una representación que muestra las estructuras de rueda de los péptidos KSH3 a KSH10.
- Fig. 19. Una representación que muestra los resultados de las pruebas del desplazamiento intracelular con la adición de 25 μ M de cada péptido marcado con fluorescencia. Los paneles superiores muestran la fluorescencia de FITC; los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas de interferencia diferencial de células junto con imágenes fluorescentes.
- Fig. 20. Una representación que muestra las estructuras de rueda de los péptidos KSH2 y KSH2-1 a 2-4.
- Fig. 21. Una representación que muestra los resultados de las pruebas del desplazamiento intracelular con la adición de 50 μ M, 25 μ M y 12,5 μ M de cada péptido marcado con fluorescencia. Los paneles superiores muestran la fluorescencia de FITC; los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas de interferencia diferencial de células junto con imágenes fluorescentes.

El mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se describe a continuación más detalladamente.

(1) Péptidos

En la presente invención, los péptidos incluyen la forma L o la forma D de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X o X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B. En esta secuencia de aminoácidos, B es arginina o lisina, y al menos uno de O¹ u O² son arginina, y Z es un aminoácido hidrófobo, y J es serina o alanina, y X es un aminoácido elegido aleatoriamente. En este documento, B es deseablemente arginina. Si al menos uno de O¹ u O² son arginina, el otro puede ser un aminoácido elegido aleatoriamente. El aminoácido hidrófobo para Z es cualquiera de leucina, fenilalanina, isoleucina, valina, tirosina, y triptófano, y es deseablemente leucina, fenilalanina, isoleucina o triptófano, y lo más deseablemente es isoleucina o triptófano.

Al poseer la secuencia de aminoácidos B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X o X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B puede ser que tengan una secuencia de aminoácidos de los 15 aminoácidos mostrados por dichas secuencias descritas solas, o puede tener un aminoácido o varios aminoácidos elegidos aleatoriamente en el extremo C-terminal y/o extremo N-terminal de dicha secuencia de aminoácidos descrita. También se entiende lo mismo para el péptido que es capaz de transportar proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos. Los aminoácidos elegidos aleatoriamente no están particularmente limitados, y deseablemente son aminoácidos básicos (arginina, histidina, lisina), triptófano, prolina, glicina, cisteína y alanina, más deseablemente glicina, cisteína y arginina. Su número no está particularmente limitado.

Como péptido más deseable de los péptidos mostrados por la secuencia de aminoácidos B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X o X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B, se puede mencionar la forma L o la forma D de un péptido que consiste en una de las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NOS:1 a 34 en el listado de secuencias y su péptido de cadena invertida. Como péptido todavía más deseable, se puede mencionar la forma L o la forma D de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33 o 34 en el listado de secuencias. El péptido más deseable es el aminoácido mostrado por SEQ ID NO:1, 7, 8, 9, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 32, 33 o 34 en el listado de secuencias.

En la presente invención, un péptido de cadena invertida se refiere a un péptido obtenido invirtiendo la disposición de aminoácidos del extremo N-terminal al extremo C-terminal de una cierta secuencia, por ejemplo, (extremo N)-A-B-C-D-(extremo C), para obtener el péptido (extremo N)-D-C-B-A-(extremo C).

En la presente invención, los péptidos también incluyen, además de los péptidos ya mencionados, péptidos que tienen la forma L o la forma D del péptido mostrada por alguna de las SEQ ID NOS:35 a 47 en el listado de secuencias y su péptido de cadena invertida. Son particularmente deseables de estos péptidos la forma L o la forma D de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:35, 36, 38, 39, 42, 43, 45, 46 o 47 en el listado de secuencias.

El poseer la forma L o la forma D de un péptido y su péptido de cadena invertida significa tener de manera aleatoria uno o varios aminoácidos en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal de las 15 secuencias de aminoácidos mostradas por alguna de SEQ ID NOS:35 a 47 en el listado de secuencias. También se entiende lo mismo para el péptido que es capaz de transportar proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos. Aunque los aminoácidos elegidos aleatoriamente no estén particularmente limitados, los aminoácidos básicos (arginina, histidina, lisina), triptófano, prolina, glicina, cisteína y alanina son deseables, y glicina, cisteína y arginina son más deseables. Su número no está particularmente limitado.

Además, los péptidos de la presente invención mostrados por SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias incluyen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en donde 1 o 2 aminoácidos han sido delecionados, añadidos, insertados o sustituidos por otros aminoácidos, o péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que consiste en una combinación de estos. También se entiende lo mismo para el péptido que tiene la capacidad de desplazarse a las células. En este caso, aun si un aminoácido ha sido insertado, delecionado o sustituido, se pueden mencionar las secuencias de aminoácidos capaces de transportar proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos a una frecuencia similar a la de los péptidos mostrados por SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias. Si un aminoácido ha sido insertado, delecionado o sustituido, la posición de la introducción, eliminación o sustitución no está particularmente limitada.

La presente invención incluye particularmente un péptido con tres aminoácidos del extremo C-terminal delecionados del péptido mostrado por la secuencia B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X. El péptido puede ser un péptido que tiene 1 o 2 aminoácidos del extremo C-terminal delecionados.

En este documento, los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias son nuevas secuencias sin homología con ningún PTD conocido de los que han sido publicados hasta ahora, y que no mostraron ninguna homología con ninguna secuencia de cDNA humana que haya sido publicada hasta ahora.

El péptido de la presente invención se puede preparar según un método comúnmente conocido de la síntesis de péptidos y la sustitución, la adición o la delección se puede conseguir fácilmente cambiando el tipo de aminoácido protegido. Se pueden introducir aminoácidos especiales, tales como el D-aminoácido y sarcosina (N-metilglicina). Los métodos de síntesis del péptido incluyen, por ejemplo, la síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida; después de la reacción sintética, se puede purificar y aislar el péptido usado en la presente invención combinando métodos ordinarios de purificación, por ejemplo, extracción con disolventes, destilación, columna cromatográfica, cromatografía líquida o recristalización.

Los métodos comúnmente conocidos de síntesis de péptidos incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en de (i) a (v) más abajo.

(i) M. Bodanszky y M.A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Editores Interscience, Nueva York, (1966)

(ii) Schroeder y Luebke, *The Peptide*, Academic Press, Nueva York, 1965

(iii) Nobuo Izumiya, *et al. Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken*, publicado por Maruzen Co. (1975)

(iv) Haruaki Yajima y Shunpei Sakakibara: *Seikagaku Jikken Koza 1*, Tanpakushitsu no Kagaku IV, 205 (1977)

(v) Haruaki Yajima, editor: *Zoku Iyakuhi no Kaihatsu*, volumen 14,

Síntesis de Péptido, Hirokawa Shoten

(2) Secuencias de ADN y los ADN

En la presente invención, los ADN incluyen un ADN que consiste en la secuencia de ADN que codifica el péptido representado por la secuencia de aminoácidos mostrada por alguna de SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias; específicamente, dichos ADN incluyen, pero sin limitación, un ADN que consiste en la secuencia de ADN mostrada por SEQ ID NO:48 o 49 en el listado de secuencias. La secuencia de ADN mostrada por SEQ ID NO:48 o 49 en el listado de secuencias codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:33 o 34 en el listado de secuencia, respectivamente.

En la presente invención, el ADN contiene un ADN que consiste en una secuencia de ADN que forma híbridos con una cadena complementaria del ADN que consiste en la secuencia de ADN que codifica el péptido mostrado por alguna de SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias en condiciones rigurosas.

En la presente invención, la secuencia de ADN que forma híbridos en condiciones rigurosas contiene una secuencia de ADN que tiene una homología de aproximadamente el 80 % o más, preferiblemente de aproximadamente el 90 % o más, más preferiblemente de aproximadamente el 95 % o más, con una cadena complementaria de la secuencia de ADN que codifica el péptido mostrado por SEQ ID NO:1 o 2 en el listado de secuencias. La hibridación se puede realizar según algún método comúnmente conocido o algún método basado en ésta, por ejemplo, algún método descrito en *Molecular Cloning*, 2ª edición (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) y otros por el estilo. Las condiciones altas y rigurosas se refieren, por ejemplo, a condiciones que implican una concentración de sodio de aproximadamente 19 mM a aproximadamente 40 mM, preferiblemente de aproximadamente 19 mM a aproximadamente 20 mM, y una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C, preferiblemente de aproximadamente 60°C a aproximadamente 65°C. En particular, es el más preferible un caso en donde la concentración de sodio es aproximadamente 19 mM y la temperatura es aproximadamente 65°C.

Las secuencias de ADN de la presente invención incluyen secuencias que tienen una identidad de aproximadamente el 50 % o más respecto a las secuencias de ADN que codifican los péptidos mostrados por SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias. Las secuencias de ADN de la presente invención contienen una secuencia de ADN que tiene una identidad preferiblemente de aproximadamente el 60 % o más, más preferiblemente de aproximadamente el 70 % o más, todavía más preferiblemente de aproximadamente el 80 % o más, todavía aún más preferiblemente de aproximadamente el 90 % o más, aún más preferiblemente de aproximadamente el 95 % o más.

Las secuencias de ADN de la presente invención incluyen las secuencias de ADN que codifican los péptidos mostrados por SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias en donde las bases han sido insertadas, delecionadas o sustituidas. En este documento, como número de bases insertadas, suprimidas o sustituidas, se pueden mencionar 1 base o 2 bases o más; por ejemplo, de 1 base a 10 bases, preferiblemente de 1 base a 5 bases. En este caso, aun si una base ha sido insertada, delecionada o sustituida, se puede mencionar una secuencia de ADN capaz de transportar proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos a una frecuencia similar a la de las secuencias de ADN que codifican los péptidos mostrados por SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias. Si se ha insertado, delecionado o sustituido una base, la posición de la introducción, delección o sustitución no está particularmente limitada.

El ADN de la presente invención se puede sintetizar según algún método comúnmente conocido. El cDNA que codifica la proteína de fusión, de ser preparado; se puede obtener por amplificación mediante el método PCR utilizando cebadores.

Los cebadores que se pueden usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, un cebador para su uso en la preparación de un cDNA que codifica una proteína de fusión con una proteína fluorescente verde eGFP (Proteína Fluorescente Verde mejorada) por sus siglas en inglés, "enhanced green florescent protein".

(3) Vectores recombinantes y transformantes

Los vectores recombinantes usados en la presente invención incluyen vectores que pueden ser expresados en células procariotas tales como *Escherichia coli* (por ejemplo, pBR322, pUC119 o sus derivados). Además, en células eucarióticas, los vectores de expresión para levadura incluyen, por ejemplo, vectores de plásmido, tales como pAURI2 (Takara Bio Inc). Los vectores que se pueden expresar en células derivadas de mamíferos incluyen, por ejemplo, vectores de plásmido tales como pcDNAS.I (Invitrogen) y vectores virales, tales como el ADN de pDON-AI (Takara Bio Inc). [0028]

Un vector recombinante de la presente invención se prepara recombinando todo o una parte del ADN que tiene la secuencia de ADN de la presente invención con estos vectores recombinantes por algún método comúnmente conocido.

El vector recombinante se puede obtener, por ejemplo, por algún método descrito en *Molecular Cloning*, 2ª edición (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989).

El transformante de la presente invención se refiere a un transformante que comprende un vector recombinante de la presente invención. Como huésped, se pueden usar células de *Escherichia coli*, levadura, animal y otras por el estilo. La *Escherichia coli* es preferible. También se pueden usar como huéspedes auxótrofos y cepas sensibles a antibióticos.

El transformante de la presente invención se puede preparar según algún método comúnmente conocido. Por ejemplo, la transformación se puede realizar según los métodos descritos en *Molecular Cloning*, 2ª edición (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, , 1989), como el método de polietilenglicol de protoplastos y el método de electroporación.

(4) Sustancias ligadas al péptido

En la presente invención, las sustancias ligadas al péptido incluyen las que contienen el péptido mostrado por la secuencia de aminoácido: B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X o X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por alguna de SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias y una sustancia biológicamente activa.

En la presente invención, el péptido mostrado por la secuencia de aminoácidos: B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X o X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B o el péptido mostrado por alguna de SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias se puede utilizar como péptido que penetra dentro de la célula; ligando el péptido de la presente invención a una sustancia biológicamente activa, la sustancia biológicamente activa puede ser transportada dentro de las células y/o dentro de los núcleos. Más preferiblemente, la sustancia biológicamente activa es transportada dentro de las células. En este documento, las células son células de animal, en particular células humanas. Las células humanas pueden ser células adhesivas o células flotantes, y pueden ser células que configuren varios órganos en los organismos vivos.

En la presente invención, las sustancias biológicamente activas incluyen proteínas que tienen alguna actividad biológica, péptidos que tienen alguna actividad biológica, liposomas que encapsulan fármacos, liposomas que encapsulan fármacos polietilenglicolados (también denominados en este documento de aquí en adelante como "liposomas que encapsulan fármacos PEGlicolados"), compuestos de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, perlas magnéticas, nanopartículas y fagos.

En este documento, las proteínas que tienen alguna actividad biológica incluyen proteínas para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de alguna enfermedad y otros por el estilo, siendo proteínas con tamaños de aproximadamente 10 KDa a aproximadamente 500 KDa; de aproximadamente 10 KDa a aproximadamente 120 proteínas KDa particularmente deseables. Específicamente, dichas proteínas incluyen, pero sin limitación, enzimas, anticuerpos, factores de transcripción y sus péptidos parciales. Las enzimas incluyen SOD (*Molecules and Cells* 2005, **19**, 191-197, W.S. Eum *et al.*). Los anticuerpos incluyen anticuerpos contra proteínas intracelulares, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos contra proteínas ajenas, tales como virus y otros por el estilo (*Current Molecular Medicine* 2004, **4**, 519-528, M.N. Lobato y T.H. Rabbitts, *Molecular Therapy* 2003, **8**, 355-366, Y.Y. Wheeler *et al* y similares). Los factores de transcripción incluyen el factor de transcripción MI (factor de transcripción asociado a la microftalmia: también denominado en este documento de aquí en adelante "MITF") y otros por el estilo. En este documento, MITF es una especie de factor regulador de la transcripción que existe en organismos vivos, siendo una proteína capaz de regular la expresión de genes c-kit, característico de los mastocitos. Específicamente, dichos factores de transcripción incluyen, pero sin limitación, los diversos MITF descritos en el documento JP-A-2004-201547.

En la presente invención, los polipéptidos que tienen una actividad biológica incluyen péptidos para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la enfermedad y otros por el estilo, siendo deseables los péptidos que tienen de 2 a 100 aminoácidos; y los péptidos que tienen de 4 a 30 aminoácidos particularmente deseables. Específicamente, dichos péptidos incluyen, pero sin limitación, HSP (Proteína de Choque Térmico, por sus siglas en inglés "Heat Shock Protein") péptido análogo 20 (*J Appl Physiol* **98**: 1836-1845, 2005), péptido antibacteriano KLAK (*Cancer Research* **61**, 7709-7712, 2001), HIF-1α (*Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10423-10428, 2002), PKC (Proteína Quinasa C) péptido inhibitorio δ (*Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11114-11119, 2001), VIVIT (*Nature Medicine* **10**: 305-309, 2004) y otros por el estilo.

En la presente invención, los liposomas incluyen vesículas unilaminares pequeñas (también denominadas en este documento de aquí en adelante "SUV", por sus siglas en inglés "small unilamellar vesicles"), vesículas unilaminares grandes (también denominadas en este documento de aquí en adelante "LUV", por sus siglas en inglés "large unilamellar vesicles"), vesículas multilaminares (también denominadas en este documento de aquí en adelante "MLV" por sus siglas en inglés "multilamellar vesicles") y otros por el estilo; los preferibles son SUV o LUV. Además, los liposomas que encapsulan fármacos incluyen fármacos antiinflamatorios, tales como el sodio diclofenac y tobramicina encapsulados en los liposomas descritos anteriormente.

En la presente invención, los liposomas que encapsulan fármacos PEGilados (PEG) incluyen liposomas que encapsulan al fármaco unido a la superficie de éste.

Un fármaco encapsulado por liposoma o un fármaco encapsulado por liposoma PEGilado en la presente invención se puede preparar por los métodos descritos en los documentos JP-A-HEI-4-346918, JP-A-HEI-10-29930, el impreso para la publicación de la solicitud de patente internacional N°. 97/29128 o el impreso para la publicación de la solicitud de patente Internacional No 01/064743.

En la presente invención, los compuestos de bajo peso molecular incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios, tales como el sodio diclofenac, tobramicina y ciclosporina.

En la presente invención, los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, plásmidos, siARN y ADN antisentido para genes relacionados con la enfermedad.

En la presente invención, las perlas magnéticas incluyen, por ejemplo, partículas de óxidos de iones supermagnéticos introducidas en células T, células B o macrófagos para rastrear la localización de dichas células por MRI (*Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 637-651, 2005).

En la presente invención, las nanopartículas incluyen, por ejemplo, nanopartículas que tienen proteínas, compuestos de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros por el estilo encapsulados en éstas (*Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 637-651, 2005).

En la presente invención, los fagos incluyen, por ejemplo, fagos M13 que incorporan varias unidades de expresión de cDNA (*Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 529-546, 2005).

En la presente invención, una sustancia ligada al péptido que contiene el péptido de la presente invención y una proteína que tiene actividad biológica como se describe anteriormente se puede obtener cultivando células huésped transformadas usando un vector recombinante que comprende un ADN que codifica la sustancia, y aislando la proteína producida así por algún método, tal como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El ADN usado en esta invención puede ser un ADN que comprenda una fusión del gen que codifica el péptido de la presente invención y el gen que codifica una proteína o un polipéptido con la actividad biológica que se describe anteriormente. O bien, para obtener una sustancia ligada al péptido que contiene el péptido de la presente invención y la proteína que tiene actividad biológica, se pueden expresar los genes respectivos para adquirir el péptido de la presente invención y la proteína o el polipéptido con actividad biológica, y se pueden fusionar mediante alguna reacción química. Como medio de fusión por reacción química, se puede mencionar un puente de disulfuro usando un residuo cisteína y otros por el estilo. O bien, se puede preparar la sustancia ligada al péptido que contiene el péptido de la presente invención y una proteína que tiene actividad biológica por un método que use a un agente de reticulación químico. En este caso, es preferible prevenir la reticulación entre el péptido de la presente invención y el sitio activo funcional de la proteína con actividad biológica; como método de reticulación química, se puede mencionar el método descrito en el documento JP-A-HEI-10-33186 y otros por el estilo.

Además, usando el método de reticulación química, también se puede unir el péptido de la presente invención a un fármaco encapsulado por un liposoma, un fármaco encapsulado por un liposoma PEGilado o un compuesto de bajo peso molecular.

Uniendo el péptido en la presente invención a un fármaco encapsulado por el liposoma o un fármaco encapsulado por el liposoma PEGilado, el fármaco encapsulado en el liposoma se puede administrar dentro de las células. Los métodos de unión del péptido en la presente invención incluyen, por ejemplo, un método en donde el residuo cisteína es introducido en el extremo N-terminal o C-terminal, y unión del péptido a un fármaco encapsulado por liposoma que tiene un grupo maleimida o un fármaco encapsulado por liposoma PEGilado vía un grupo SH y otros por el estilo.

(5) Productos farmacéuticos

Se puede utilizar la sustancia ligada al péptido de la presente invención como un producto farmacéutico. Además, la sustancia biológicamente activa deseada puede ser transportada dentro de las células y/o dentro de los núcleos uniéndose al péptido de la presente invención a la sustancia biológicamente activa; por lo tanto, según la clase de sustancia biológicamente activa que se une, el péptido de la presente invención puede ser utilizado como un fármaco terapéutico y/o fármaco profiláctico para una amplia variedad de enfermedades. La sustancia biológicamente activa que se une al péptido de la presente invención es preferiblemente una proteína que tiene actividad biológica. Más preferiblemente, uniéndose el péptido de la presente invención a un mutante MITF, el péptido de la presente invención puede ser utilizado como un fármaco antialérgico.

De ser usado como producto farmacéutico, la sustancia unida al péptido en la presente invención se puede preparar como una preparación y se puede administrar según métodos comúnmente conocidos. Por ejemplo, la sustancia unida al péptido se puede administrar a seres humanos u otros mamíferos en la forma de un líquido como tal, o como una composición farmacéutica en forma de una forma farmacéutica apropiada, oralmente o parenteralmente.

Para producir una solución y otras formas similares, se puede usar un disolvente o agente de suspensión apropiado.

En la producción de comprimidos o cápsulas como forma farmacéutica apropiada, se puede usar un excipiente apropiado. Las preparaciones líquidas para administración oral, es decir, jarabes, suspensiones, soluciones y otros por el estilo, comprenden a un diluyente inerte comúnmente usado. Las preparaciones también pueden comprender, además del diluyente inerte, agentes auxiliares, por ejemplo, agentes humectantes, adyuvantes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromáticos, colorantes, conservantes, estabilizadores y otros por el estilo.

La dosis de la sustancia unida al péptido de la presente invención para seres humanos se determina según la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, duración de la administración, el método de administración, la velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la condición del paciente tratado, en consideración a estos y otros factores. Por ejemplo, la dosis es de aproximadamente 0,01 mg./kilogramo a aproximadamente 1,0 mg./kilogramo, y se puede administrar una vez al día o en partes divididas.

Ejemplos

La presente invención se describe además más específicamente según los ejemplos siguientes, con los cuales, sin embargo, la presente invención nunca se encuentra limitada.

Ejemplo 1 Prueba del paso a través de la membrana celular usando péptidos sintéticos

Ejemplo 1-1 Sección de secuencias peptídicas que penetran las células

Se concentraron secuencias peptídicas transferibles intracelularmente según el método descrito en el documento JP-A-2005-13073, usando una biblioteca de células Jurkat (ATCC NO. TIB-152). Específicamente, después de preparar una biblioteca de virus *in vitro* que presentaba péptidos aleatorios de 15 aminoácidos (abreviados de aquí en adelante en este documento IVV) (escala de la biblioteca 10^{12}), la biblioteca fue añadida a las células HeLa (ATCC NO. CCL2) o a las células Jurkat. Después, los cDNA de IVV que se habían desplazado en las células fueron recuperados por PCR, los IVV se prepararon otra vez y se añadieron a las células. Repitiendo la operación de adición-recuperación, los "péptidos que se desplazaron en las células" que estaban presentes en la biblioteca se concentraron. Para identificar las bibliotecas en donde los péptidos intracelularmente transferibles habían sido concentrados en las diversas etapas de la operación de concentración, se seleccionaron aleatoriamente 11 clases de secuencias de aminoácidos de las bibliotecas después de la 5ª a la 8ª operación de concentración, y los péptidos se examinaron según su capacidad de desplazamiento intracelular.

Ejemplo 1-2 Análisis por microscópico confocal

Con el PTD sacado de la proteína TAT de VIH mostrada por SEQ ID NO: 50 en la secuencia expuesta como control positivo (en las FIG. 1 a FIG. 3, denominado "Positivo" "o TAT"), y un mutante del PTD derivado de TAT mostrado por SEQ ID NO:51 en el listado de secuencias, publicado por Ulo Langel *et al.* ("Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications", *Series: Pharmacology and Toxicology: Basic and Clinical Aspects* Volumen: 3, 2002), como control negativo (en la FIG. 1, denominado "Negativo"), los péptidos de las 11 secuencias seleccionadas en el Ejemplo 1-1 fueron evaluados.

Los péptidos de las 11 secuencias seleccionadas en el Ejemplo 1-1 se sintetizaron por el método en fase sólida y se marcaron fluorescentemente acoplado la 5,6-carboxifluoresceína al extremo N-terminal de cada péptido. Además, los péptidos se purificaron por HPLC obteniéndose una pureza del 70 % o más. Posteriormente, cada péptido fluorescentemente marcado fue disuelto en Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 10 % para obtener 1 mM (de aquí en adelante denominado en este documento solución peptídica).

Se usaron tres clases de células para incorporar los péptidos: células CHO (ATCC NO. CCL-61), células HeLa y células Jurkat. Se inocularon por separado 10^4 células CHO y células HeLa y 10^5 células Jurkat en una placa de 96

pocillos y se cultivaron durante 2 o 3 días. Posteriormente, cuando las células se hicieron confluentes, cada solución peptídica fue añadida a cada tipo de célula, y las células se incubaron durante 1 hora. Después de que cada tipo de la célula se lavara con PBS tres veces, se añadieron 100 µL de una solución de tripsina-EDTA 1 mM al 0,25 % y la tripsinización fue realizada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añadieron 400 µL de PBS (FCS al 10 %) para neutralizar la tripsina, las células se lavaron tres veces con 1 mL de HBSS (solución salina equilibrada de Hanks/ producida por Invitrogen). Después del lavado, las células se suspendieron en 50 µL de HBSS y se analizaron utilizando un microscopio confocal. Las medidas y el análisis fueron realizados usando un sistema de un microscopio láser de interferencia diferencial confocal (Bio-Rad, Radiance2100/Green He-Ne, 488 nm, microscopio: Nikon, ECLIPSE E600).

Como consecuencia, el péptido de la nueva secuencia del candidato de PTD mostrada por SEQ ID NO:33 en el listado de secuencias (en FIG. 1 a FIG. 3, denominado "KSH1") mostró la transferibilidad intracelular más alta. Los resultados para el péptido KSH1, control positivo y control negativo son mostrados en la FIG. 1. En todas las células CHO, células de HeLa y células Jurkat, se observó la fluorescencia del péptido KSH1. La intensidad de fluorescencia del péptido KSH1 fue más alta que la intensidad de fluorescencia del control positivo. Además, el péptido intracelularmente transportado no fue localizado, pero fue detectado tanto en el núcleo como en citoplasma.

A partir de estos resultados, se encontró que el péptido KSH1 se desplazaba en las células. También se encontró que su cantidad excedía la del los péptido TAT derivado del VIH, un PTD convencionalmente conocido.

Además, las células CHO se inocularon en el sistema Chamber Slide™ (producido por Nunc), se añadió a las células CHO 25 µM de cada uno del péptido KSH1 y del control positivo, y fue determinada la transferibilidad intracelular de esto usando un microscopio confocal.

Los resultados se muestran en la FIG. 2.

A partir de estos resultados se encontró que el péptido KSH1 fue desplazado en todas las células CHO.

Ejemplo 1-3 Análisis de citometría de flujo

Cada solución peptídica, ajustada a 1 mM, fue diluida con un medio a tres niveles, 100 µM, 50 µM, y 25 µM, y se añadió a las células. Se usaron tres clases de células: células CHO, células HeLa y células Jurkat. Después de añadir cada solución peptídica, las células se incubaron durante 1 hora. Después de lavar las células con PBS tres veces, se añadieron 100 µL de una disolución de tripsina-EDTA 1 mM al 0,25 %, y se realizó tripsinización a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de añadir 400 µL de PBS (FCS al 10 %) para parar la tripsinización, las células se lavaron con 1 mL de HBSS tres veces. Después del lavado, las células se suspendieron en 500 µL de PBS (FCS al 10 %) y se sometieron a un análisis de citometría de flujo (de aquí en adelante en este documento, FACS) usando FACS Calibur (Becton Dickinson).

Los resultados se muestran en la FIG. 3. La ordenada indica el número de células; la abscisa indica la intensidad de fluorescencia.

A partir de estos resultados se encontró que el péptido KSH1 mostraba una transferibilidad intracelular de 3 a 10 veces más alta que el control positivo, con una potente capacidad de desplazamiento.

Ejemplo 2 Confirmación de la actividad de desplazamiento usando la proteína de fusión eGFP

Ejemplo 2-1 Construcción del vector de expresión de His-eGFP

Con un cDNA de eGFP (eGFP-NII) (producido por Amersham Pharmacia) como plantilla, fue construido por el método PCR el "vector de expresión His-eGFP" con un marcador de His y sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción.

La PCR fue realizada usando el kit PCR Easy-A (producido por Stratagene). Un ADN del cDNA de eGFP (eGFP-NII) para la plantilla fue diluido en 200 ng/mL. Los ADN sintéticos para los cebadores fueron ajustados a 20 µM. se mezclaron la plantilla, el cebador Fw y el cebador Rv, cada 1 µL, 10 µL del tampón de PCR Easy-A, 8 µL de dNTP (2,5 mM) y 0,5 µL de Easy-A, y esta mezcla fue rellenada con agua destilada estéril hasta completar 100 µL. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron como sigue: 94°C durante 2 minutos, 1 ciclo; y 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, 30 ciclos.

En esta invención, la PCR fue realizada usando el cebador Fw mostrado por SEQ ID NO:116 en el listado de secuencia (Nco-His-GFP-f) y el cebador Rv mostrado por SEQ ID NO:117 en el listado de secuencia (GFP-Rev-Bam).

Después, para clonarse en un vector, el fragmento amplificado por PCR fue digerido con las endonucleasas de restricción NcoI y BamHI, y fue recuperado un fragmento de ADN de 0,8 kb. El fragmento de ADN recuperado fue insertado en pET14b. El "vector de expresión His-eGFP" así construido es un vector en el que la proteína de fusión His-eGFP es expresada en el control del promotor T7.

Ejemplo 2-2 Construcción del His- nueva secuencia candidato de PTD - vector de expresión eGFP

Por un método PCR, con un cDNA de eGFP (eGFP-NII) como plantilla, "un vector de expresión His-KSH1-eGFP" con un marcador His, fue construida una nueva secuencia candidato de PTD y sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción.

5 La PCR fue realizada usando el cebador Fw mostrado por SEQ ID NO:118 en el listado de secuencia (KSH-kp-nd-GF-f) y el cebador Rv mostrado por SEQ ID NO:117 en el listado de secuencia (GFP-Rev-Bam). Además la PCR fue realizada con el fragmento amplificado como plantilla, usando el cebador FV mostrado por SEQ ID NO:119 en el listado de secuencia (KSH-kp-nd-f2) y el cebador Rv mostrado por SEQ ID NO:117 en el listado de secuencia (GFP-Rev-Bam).

10 Posteriormente, para clonarlo en un vector, el fragmento amplificado por PCR fue digerido con las endonucleasas de restricción NcoI y BamHI, y fue recuperado un fragmento de ADN de 0,8 kb. El fragmento de ADN recuperado fue insertado en pET14b.

El "vector de expresión de His-KSH1-eGFP" así construido tiene la proteína de fusión His-KSH1-eGFP expresada en el control del promotor T7.

Ejemplo 2-3 Preparación de proteínas de fusión eGFP

Después de que la cepa de BL21LysS, derivada de la cepa B de Escherichia coli, fuera transformada con el "vector de expresión His-eGFP" y el "vector de expresión de His-KSH1-eGFP" fuera construido en los Ejemplos 2-1 y 2-2, respectivamente, cada transformante fue precultivado en 20 mL de LB (37°C, 15 horas).

20 El caldo de precultivo fue inoculado a 1 L de LB al 2 %, y cultivado a 37°C durante 2,5 horas. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, y se realizó un cultivo más durante 4 horas. Después de la centrifugación (4000 revoluciones por minuto, 20 minutos Hitachi himac CR7) y de la recolección de las células bacterianas, las células bacterianas se suspendieron en 50 mL de PBS. Además, la suspensión fue centrifugada (3500 revoluciones por minuto, 20 minutos KUBOTA 5200), y se recuperaron las células bacterianas. Posteriormente, las células bacterianas se suspendieron en 30 mL de PBS y se sometieron a ciclos de congelación-descongelación tres veces.

25 Después de la adición de 15 µL de la solución de DNasa (Benzonase Takara NV677 bio) e incubación de las células bacterianas a temperatura ambiente durante 10 minutos, se realizó un centrifugado (18000 revoluciones por minuto, 20 minutos TOMY UD-201), y el sobrenadante fue recuperado. El sobrenadante fue aplicado a una columna Ni-NTA equilibrada con PBS (QIAGEN 30430). Después de que la columna fuera lavada con 50 mL de un PBS que contenía imidazol 10 mM, las proteínas de fusión se eluyeron con 4 mL de un PBS que contenía imidazol 200 mM. 15 µL del eluato se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE (gel de gradiente PAG-Mini, al 4-20 %, Productos químicos Daiichi Pure), el gel después de ser sometido a electroforesis se tiñó usando Quick CBB (Industrias Químicas Wako Pure, 299-50101) y se realizó la detección de proteínas.

30

Como consecuencia, se detectaron los grupos con los tamaños deseados correspondientes a la proteína de fusión His-KSH1-eGFP y a la proteína de fusión His-eGFP.

Ejemplo 2-4 Confirmación del desplazamiento intracelular de la proteína de fusión KSH1

Se realizó una prueba de desplazamiento intracelular de cada proteína de fusión usando células CHO.

Se inocularon células CHO o células HeLa en una placa de 96 pocillos a 10^4 células por pocillo; 2 días más tarde, se usaron las células después de hacerse confluyente. Después de lavar las células con medio MEM tres veces, se añadió una solución peptídica que comprendía His- nueva secuencia candidato de PTD - proteína de fusión eGFP y una solución peptídica que comprendía la proteína de fusión His-eGFP, cada 100 µL, y las células se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de lavar las células con PBS tres veces, las células fueron recuperadas vía tripsinización. Después de que las células recuperadas se lavaran con medio MEM un tiempo, y con PBS (FCS al 10 %) tres veces, las células se suspendieron en 100 µL de PBS (FCS al 10 %) y se sometieron a microscopia confocal.

40

A consecuencia de la microscopia confocal, se detectó la fluorescencia de eGFP en las células a las cuales había sido añadida la solución peptídica que comprendía His - nueva secuencia candidato de PTD - proteína de fusión eGFP.

45

Los resultados se muestran en la FIG. 4.

A partir de estos resultados, se encontró que His - nueva secuencia candidato de PTD - proteína de fusión eGFP (en la FIG. 4, denominado "KSH1") se desplazó en las células. Sin embargo, no se detectó ningún desplazamiento de His-eGFP (en la FIG. 4, denominado "His").

50

Además, debido a que se detectó His - nueva secuencia candidato de PTD - proteína de fusión eGFP con un modelo de punto por punto, fue demostrada su localización en el endosoma. Esto discrepa con el hecho de que el péptido no se localiza solo en las células como se muestra en el Ejemplo 1-2. Se ha publicado que las proteínas de fusión de

PTD son incorporadas en las células por macropinocitosis y que se localizan en el endosoma (*J Control Release*. 20 de enero de 2005; **102** (1):247-53 “Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis”. Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF.). Como consecuencia, se sugirió que la nueva secuencia candidato de PTD podía penetrar a través de la membrana celular por el mismo mecanismo que otros péptidos PTD.

5 Ejemplo 3 Prueba del desplazamiento intracelular usando péptidos sintéticos de secuencias PTD modificadas

En los Ejemplos y dibujos de más abajo, los números de identificación de secuencia en el listado de secuencias correspondientes a los nombres de los péptidos individuales son los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

indicación en Ejemplos y Figuras	SEQ ID NO:
KSH1-1	1
KSH1-2	2
KSH1-3	3
KSH1-4	4
KSH1-5	5
KSH1-6	6
KSH1-7	7
KSH1-8	8
KSH1-9	9
KSH1-11	10
KSH1-12	11
KSH1-13	12
KSH1-14	13
KSH1-15	14
KSH1-16	15
KSH1-17	16
KSH1-18	17
KSH1-19	18
KSH1-20	19
KSH1-21	20
KSH1-22	21
KSH1-23	22
KSH1-24	23
KSH1-25	24
KSH1-26	25
KSH1-27	26
KSH1-28	27
KSH1-29	28

KSH1-30	29
KSH1-33	30
KSH1-34	31
KSH1-35	32
KSH1	33
KSH1-36	34
KSH3	35
KSH4	36
KSH5	37
KSH6	38
KSH7	39
KSH8	40
KSH9	41
KSH10	42
KSH2	43
KSH2-1	44
KSH2-2	45
KSH2-3	46
KSH2-4	47
Positivo o TAT	50
Negativo	51

Ejemplo 3-1 Análisis de KSH1-1 a KSH1-9

- La predicción de la estructura de rueda (*Trends Genet.* **16** (6): 276-7, 2000) de la secuencia primaria del péptido KSH1 (SEQ ID NO:33 en el listado de secuencia) reveló hallazgos característicos de la formación de un grupo lisina/arginina, la presencia de dos triptófanos, el depósito de prolina, un aminoácido rígido, y la presencia de arginina en una posición pegada a triptófano, aunque la arginina no estaba implicada en la formación del grupo. Como consecuencia, a fin de determinar la implicación de estas secuencias características en el desplazamiento intracelular, fueron diseñadas las SEQ ID NOS:1 a 9 del listado de secuencias (FIG. 5). Cada péptido fue sintetizado, se marcó fluorescentemente, se purificó y se disolvió de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, se realizó una prueba del desplazamiento en células CHO, y se realizó una evaluación por análisis con microscópico confocal y FACS. El análisis FACS se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3. Para el péptido KSH1 y las secuencias PTD modificadas, es decir, péptidos de KSH1-1 a KSH1-9 (SEQ ID NOS:1 a 9 en el listado de secuencia), se muestran las intensidades de fluorescencia determinadas por análisis FACS en la FIG. 6. Las concentraciones de adición del péptido fueron 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M y 6,5 μ M.
- 5 Cuando la lisina del grupo lisina/arginina era sustituida con arginina (KSH1-1), a una concentración de 50 μ M, la eficacia del desplazamiento disminuía en aproximadamente el 20 % comparado con KSH1; sin embargo, cuando la concentración de péptido se reducía, el desplazamiento intracelular se acentuaba comparado con KSH1 (aproximadamente 2 veces a 25 μ M, aproximadamente 8 veces a 12,5 μ M, aproximadamente 2 veces a 6,25 μ M). Esto demostró la importancia del grupo lisina/arginina.
- 10 Después de esto, para examinar el papel de la arginina no implicada en la formación del grupo respecto a las tres argininas que estaban presentes en KSH1, esta arginina fue sustituida con alanina. Cuando la arginina se sustituía con alanina, el desplazamiento intracelular disminuía notablemente, habiendo sólo desplazamiento intracelular a 50

μM (KSH1-3). Se encontró que este requerimiento de la arginina en los alrededores del triptófano desempeña un papel importante en el desplazamiento intracelular.

Para examinar el significado de la prolina, que se piensa que influye en la conformación de los péptidos, la prolina fue sustituida con alanina; no se observó ninguna influencia en la transferibilidad intracelular (KSH1-2).

5 El triptófano es un aminoácido característico de KSH1, y hay dos triptófanos localizados en los polos del grupo lisina/arginina en la estructura de rueda con una estructura de sándwich de treonina. Cuando los dos triptófanos se sustituían ambos con alanina, ya no se observaba ningún desplazamiento intracelular (KSH1-6). Con este hallazgo se deduce que el triptófano era importante para el desplazamiento intracelular.

10 Se examinó si la transferibilidad intracelular cambiaba aumentando el número de triptófanos. Cuando se sustituyó treonina con triptófano para formar un grupo triptófano (KSH1-7), la transferibilidad intracelular se acentuaba notablemente. Comparado con KSH1, se detectó un desplazamiento intracelular de no menos de 3 veces más alto, entre $25\ \mu\text{M}$ y $6,15\ \mu\text{M}$, y se detectó un desplazamiento intracelular de no menos de 10 veces más alto a $12,5\ \mu\text{M}$. La acentuación de la transferibilidad mostró el mismo perfil que KSH1-1. Sin embargo, aun cuando tres triptófanos se disponían uniformemente en la estructura de rueda, el desplazamiento intracelular no cambiaba (KSH1-4). A partir de este hallazgo, se pensó que la transferibilidad intracelular se acentuaba debido a la formación del grupo triptófano.

15 Ya que la transferibilidad se acentuaba formando el grupo triptófano, y teniendo en cuenta que los resultados para KSH1-1, la lisina fue sustituida con arginina (KSH1-8); el desplazamiento intracelular disminuyó a $50\ \mu\text{M}$, pero el desplazamiento a $25\ \mu\text{M}$ o menos fue acentuado. Ya que se esperaba que la ampliación del grupo triptófano acentuaría el desplazamiento intracelular, el número de triptófanos fue aumentado a 4 (KSH1-9), pero fue obtenida la misma tendencia que KSH1-8.

Ejemplo 3-2 Análisis de KSH1-11 a 1-23 y KSH1-35

25 Para determinar qué aminoácidos son importantes para el desplazamiento intracelular, se realizó la sustitución de alanina completa sobre la base de KSH1-1 para diseñar de KSH1-11 (SEQ ID NO:11 en el listado de secuencia) a KSH1-23 (SEQ ID NO:22 en el listado de secuencia) y KSH1-35 (SEQ ID NO:32 en el listado de secuencia) (FIG. 7). Cada péptido fue sintetizado, se marcó fluorescentemente, se purificó y se disolvió de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, se realizó una prueba del desplazamiento en células CHO, y se realizó una evaluación por análisis con microscópico confocal y FACS. El análisis FACS se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3. Para KSH1 y las secuencias PTD modificadas, es decir, de KSH1-11 a 23 y KSH1-35, las intensidades de fluorescencia determinadas por el análisis FACS se muestran en la FIG. 8. Las concentraciones de adición de péptido fueron $50\ \mu\text{M}$, $25\ \mu\text{M}$, $12,5\ \mu\text{M}$ y $6,5\ \mu\text{M}$.

30 Cuando se sustituía arginina y triptófano con alanina, el desplazamiento intracelular disminuía claramente. Cuando se sustituía la 7^a tirosina con alanina, no se observaba casi ningún desplazamiento intracelular (KSH1-17); se encontró que la 7^a tirosina era importante para el desplazamiento intracelular. Incluso cuando se sustituía la 1^a arginina con alanina, el desplazamiento intracelular no disminuía mucho (KSH1-11). Cuando se sustituían otros argininas con alanina, el desplazamiento intracelular disminuía (KSH1-15 y KSH 1-22); sin embargo, comparado con la 13^a arginina substituida (KSH1-3), la reducción del desplazamiento intracelular era menor.

35 En cuanto al triptófano, el 6^o triptófano era más importante para el desplazamiento intracelular que el 3^o (KSH1-13, KSH1-6). Con estas conclusiones, se pensó que la 13^a arginina, 6^a arginina y 7^a tirosina desempeñaban un papel importante en el desplazamiento intracelular, y que los otros aminoácidos contribuían de menor manera al desplazamiento intracelular (KSH1-11, KSH1-12, KSH1-14, KSH1-19, KSH1-20, KSH1-23, KSH1-35).

El único caso en el que la sustitución de alanina acentuaba el desplazamiento intracelular era la sustitución de la 8^a serina con alanina.

Ejemplo 3-3 Análisis de KSH1-24 a 1-26 y KSH1-28 a 1-30

45 En un intento de sustituir dos triptófanos con otros aminoácidos hidrófobos, fueron diseñados KSH1-24 (SEQ ID NO:23 en el listado de secuencia) a KSH1-26 (SEQ ID NO:25 en el listado de secuencia) y KSH1-28 (SEQ ID NO:27 en el listado de secuencia) a KSH1-30 (SEQ ID NO:29 en el listado de secuencia) (FIG. 9).

50 Cada péptido fue sintetizado, se marcó fluorescentemente, se purificó y se disolvió de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, se realizó una prueba del desplazamiento en células CHO, y se realizó una evaluación por análisis con microscópico confocal y análisis FACS. El análisis FACS se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3. Para KSH1 y las secuencias PTD modificadas, es decir, KSH1-24 a 1-26 y KSH1-28 a 1-30, las intensidades de fluorescencia determinadas por el análisis FACS se muestran en la FIG. 10. Las concentraciones de adición del péptido eran $50\ \mu\text{M}$, $25\ \mu\text{M}$, $12,5\ \mu\text{M}$ y $6,5\ \mu\text{M}$.

55 En primer lugar, se sustituyeron dos triptófanos con leucina (KSH1-24), fenilalanina (KSH1-25) e isoleucina (KSH1-26); el desplazamiento intracelular disminuyó con leucina, pero fue casi el mismo que en KSH1-1 con fenilalanina e

isoleucina. Como consecuencia, respecto a KSH1-18, fue diseñada una modificación para sustituir la 8ª serina de KSH1-26 con alanina, pero el desplazamiento intracelular se acentuaba muy poco.

Además, se sustituyeron dos triptófanos con otros aminoácidos hidrófobos, es decir, valina y tirosina (KSH1-29, KSH1-30); el desplazamiento intracelular disminuyó ligeramente con valina, pero hubo un buen desplazamiento intracelular con tirosina. Resumiendo estos resultados para los aminoácidos hidrófobos que sustituyen al triptófano, el desplazamiento intracelular era mejor en el orden de isoleucina, tirosina, fenilalanina, valina y leucina.

Ejemplo 3-4 Análisis de KSH1-27, KSH1-33, KSH1-34 y KSH1-36

Se diseñaron KSH1-27 (SEQ ID NO:26 en el listado de secuencia), KSH1-33 (SEQ ID NO:30 en el listado de secuencia), KSH1-34 (SEQ ID NO:31 en el listado de secuencia) y KSH1-36 (SEQ ID NO:34 en el listado de secuencia) (FIG. 11)

Cada péptido fue sintetizado, se marcó fluorescentemente, se purificó y se disolvió de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, se realizó una prueba del desplazamiento en células CHO, y se realizó una evaluación por análisis con microscópico confocal y análisis FACS. El análisis FACS se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3. Para KSH1 y las secuencias PTD modificadas, es decir, KSH1-27, KSH1-33, KSH1-34 y KSH1-36, las intensidades de fluorescencia determinadas por el análisis FACS se muestran en la FIG. 12. Las concentraciones de adición del péptido fueron 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M y 6,5 μ M.

A partir de los resultados de KSH1-18, todas las serina y treonina fueron sustituidas con alanina (KSH1-27); comparado con KSH1-1, el desplazamiento intracelular disminuyó ligeramente, pero el desplazamiento a concentraciones bajas fue casi el mismo.

En KSH1-3, cuando se sustituía la arginina (13ª) existente en los alrededores del 6º triptófano en la estructura de rueda con alanina, el desplazamiento intracelular se hacía muy poco observable. Como consecuencia, para determinar qué posición de la arginina es importante en KSH1-33, en los alrededores del triptófano en la estructura de rueda o en la 13ª posición, la 13ª arginina fue sustituida con alanina, y la 10ª treonina fue sustituida con arginina. Como consecuencia, el desplazamiento intracelular fue casi equivalente o más que KSH1-1 en la Tabla 1-1. A partir de este descubrimiento, se concluyó que la presencia de arginina en los alrededores del 6º triptófano en la estructura de rueda era importante.

Además, para determinar si la 13ª arginina ya no era necesario si la arginina estaba presente en los alrededores del 3º triptófano en KSH1-34, la existencia de la 14ª tirosina en los alrededores del 3º triptófano en la estructura de rueda fue sustituida con arginina. Como consecuencia, el desplazamiento intracelular disminuyó bastante; se concluyó que la presencia de arginina en los alrededores del 6º triptófano en la estructura de rueda era esencial para el desplazamiento intracelular.

KSH1-36, el péptido de cadena invertida de KSH1, mostró un desplazamiento intracelular acentuado a concentraciones altas comparado con KSH1, pero el desplazamiento intracelular a la inversa tendía a disminuir a concentraciones bajas.

Ejemplo 3-5 Experimentos de desplazamiento intracelular en células HeLa y células Jurkat

En células HeLa como con las células CHO, se realizaron experimentos de desplazamientos intracelulares de péptidos sintéticos de secuencias PTD modificadas por análisis con microscópico confocal. Comparado con las células CHO, el desplazamiento intracelular era generalmente más bajo, pero la tendencia era casi la misma que en las células CHO. Sin embargo, en las células HeLa respecto a las células CHO, el desplazamiento intracelular de KSH1-7 era más bajo y, a la inversa, el desplazamiento intracelular de KSH1-16 era ligeramente más alto. Para concluir, fue observado un desplazamiento intracelular mejor en células HeLa en los péptidos modificados KSH1-1, KSH1-8, KSH1-9, KSH1-18, KSH1-20 y KSH1-33.

En las células Jurkat también fueron realizados los experimentos de desplazamiento intracelulares de péptidos sintéticos de secuencias PTD modificadas por análisis con microscópico confocal. Comparado con las células CHO, el desplazamiento intracelular era generalmente bastante más bajo, pero la tendencia era casi la misma que en las células CHO y células las HeLa. Sin embargo, cuando el triptófano se sustituía con otros aminoácidos hidrófobos, el desplazamiento intracelular disminuía bastante. Para concluir, el mejor desplazamiento intracelular en células Jurkat fue observado en los péptidos modificados de SEQ ID NOS:KSH1-1, KSH1-7, KSH1-8, KSH1-9, KSH1-12, KSH1-14, KSH1-18, KSH1-20, KSH1-21 y KSH1-33 en la Tabla 1, comparado con el de SEQ ID NO:37 en el listado de secuencias.

A partir de los resultados de los Ejemplos 3-1 a 3-5, fueron identificadas las secuencias mostradas en la FIG. 13. En la figura, B es arginina o lisina, tanto O¹ como O² son arginina, Z es un aminoácido hidrófobo, J es serina o alanina y X es un aminoácido elegido aleatoriamente.

Ejemplo 4 Prueba del desplazamiento intracelular de las secuencias PTD modificadas y las proteínas de fusión eGFP en células CHO

Ejemplo 4-1 Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión eGFP

En la evaluación del desplazamiento intracelular usando las proteínas de fusión eGFP, se prepararon dos clases de de insertos (tipo C y D en la FIG. 14).

Los cebadores para la amplificación del inserto fueron diseñados para permitir la adición en marco de un marcador His y una secuencia PTD en el extremo N-terminal o C-termino de eGFP. El diseño era tal que el conector GGS o GGS sería codificado hacia delante y hacia detrás del marcador His y de la secuencia PTD, respectivamente. El resto PTD usado era una secuencia de ADN que codificaba el PTDI derivado del TAT del VIH, las partes de la secuencia de ADN de los conectores GGS y GGS que codificaban el resto PTD se prepararon para producir secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción BamHI y XhoI, respectivamente.

Diseño de cebador

Configuración de inserto C (tipo C en la FIG. 14)

Cebador directo C-F (SEQ ID NO:52 en el listado de secuencia) 5'-GCC ATG GTG AAG GGC GAG GAG CTG TTC-3'

Cebador inverso C-R1 (SEQ ID NO:53 en el listado de secuencia) 5'-CAC CGC GGC GAC GTT GTC GTC GTT TCT TCC TGC CGT AGG ATC CCC CTC CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C-3'

Cebador inverso C-R2 (SEQ ID NO:54 en el listado de secuencia) 5'-CGC TCA GCG TCG ACT CAC CCG TGA TGA TGG TGG TGA TGA CTC GAG CCG CCA CCG CGG CGA CGT TGT CGT-3'

Configuración del inserto D (tipo D en la FIG. 14)

Cebador directo D-F (SEQ ID NO:55 en el listado de secuencia) 5'-AAG CCA TGGGAG GGG GATCCT ACG GCA GGA AGA AAC GAC GAC AAC GTC GCC GCG GTG GCG GCT CGA GTA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A-3'

Cebador inverso D-R (SEQ ID NO:56 en el listado de secuencia) 5'-CCG CTC AGC GTC GAC TCACCC GTG ATG ATG GTG GTG ATG AGA ACC ACC ACC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'

Así, es posible dividir al resto PTD con BamHI y XhoI, y sustituir al mismo con ADN sintético. Con eGFP como plantilla, las anteriormente descritas SEQ ID NOS:52 a 56 en el listado de secuencias se insertaron entre las secuencias de reconocimiento de la endonucleasa de restricción NcoI y Bpu1102I de pET14b (FIG. 15).

Las secuencias de PTD modificadas se insertaron usando los oligos sintéticos mostrados en la Tabla 2, por el método mostrado en la FIG. 16.

Tabla 2

Nombre del péptido PTD modificado	Oligómero directo (F) u oligómero inverso (R)	SEQ ID NO: en el listado de secuencia
KSH1	F	58
	R	59
KSH1-1	F	60
	R	61
KSH1-2	F	62
	R	63
KSH1-3	F	64
	R	65
KSH1-4	F	66
	R	67
KSH1-5	F	68
	R	69

KSH1-6	F	70
	R	71
KSH1-7	F	72
	R	73
KSH1-8	F	74
	R	75
KSH1-9	F	76
	R	77
KSH1-11	F	78
	R	79
KSH1-13	F	80
	R	81
KSH1-18	F	82
	R	83
KSH1-20	F	84
	R	85
KSH1-21	F	86
	R	87
KSH1-26	F	88
	R	89
KSH1-27	F	90
	R	91
KSH1-28	F	92
	R	93
KSH1-30	F	94
	R	95
KSH1-33	F	96
	R	97
KSH1-36	F	98
	R	99

Se usó para el control negativo uno que tenía His sólo añadido al extremo C-terminal, se amplificó utilizando el grupo cebador de SEQ ID NO:52 y 56 en el listado de secuencias con eGFP como plantilla.

5 Después de esto la cepa de BL21/LysS, derivada de la cepa B de Escherichia coli, fue transformada con el vector de expresión construido, cada transformante fue precultivado en 20 mL de LB (37°C, 15 horas). El caldo de precultivo fue trasplantado a 1 L de LB al 2 %, y el transformante fue cultivado a 37°C durante 2.5 horas. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, y después se realizó un cultivo durante 4 horas. Después de la centrifugación (4000 revoluciones por minuto, 20 minutos Hitachi himac CR7) y de la recuperación de las células bacterianas, las células bacterianas se suspendieron en 50 mL de PBS. Se realizó un centrifugado (3500 revoluciones por minuto, 20

minutos KUBOTA 5200), y se recuperaron las células bacterianas. Las células bacterianas se suspendieron en 30 mL de HBSS y se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación tres veces. Se añadió una solución de DNasa (Benzonase Takara NV677 bio), 15 μ L, y las células bacterianas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizó un centrifugado (18000 revoluciones por minuto, 20 minutos TOMY UD-201), y el sobrenadante se recuperó. El sobrenadante se aplicó a una columna Ni-NTA equilibrada con HBSS. Después de que la columna fuera lavada con 50 mL de un imidazol 10 mM conteniendo HBSS, las proteínas de fusión se eluyeron con 4 mL de imidazol 200 mM conteniendo HBSS.

Ejemplo 4-2 Desplazamiento intracelular de secuencias PTD modificadas y proteínas de fusión eGFP en células CHO

El desplazamiento intracelular de proteínas de fusión fue investigado usando células CHO. Las células CHO se inocularon en una placa de 48 pocillos a 2×10^4 células por pocillo; las células se usaron después de volverse confluentes. Después de lavar las células con medio MEM tres veces, se añadieron 150 μ L de la solución de proteína, y las células se incubaron a 37°C durante 3 horas. Después del lavado de la placa con PBS tres veces, fue añadido tripsina al 0,25 % /EDTA a 100 μ L/pocillo, fue añadido un medio MEM que contenía FCS al 10 % a 400 μ L/pocillo, y las células fueron recuperadas. Después de lavar con HBSS tres veces, las células recuperadas se suspendieron en 100 μ L de HBSS que contenía FCS al 10 %, y se sometieron a la microscopia confocal. La concentración de adición fue ajustada para obtener intensidades de fluorescencia de 10^6 , 5×10^5 y $2,5 \times 10^5$ como se determina midiendo la cantidad de fluorescencia derivada de eGFP (Ex 485 nm/Em 535 nm) usando ARVO (Perkin-Elmer) (tiempo de medida 1 segundo).

Las proteínas de fusión de eGFP se prepararon con KSH1-1, KSH1-7, KSH1-8, KSH1-9, KSH1-18 y KSH1-33, mostrando un desplazamiento intracelular claramente acentuado comparado con el péptido KSH1 en el Ejemplo 3, así como KSH1-20, KSH1-21, KSH1-26, KSH1-27, KSH1-28, KSH1-30 y KSH1-36. Para el análisis, se prepararon proteínas de fusión tipo C para KSH1, KSH1-1, KSH1-7 y KSH1-8, y se prepararon proteínas de fusión D para los otros péptidos.

Para las proteínas de fusión eGFP preparadas, se realizó una prueba de desplazamiento intracelular usando células CHO; los resultados se muestran en la FIG. 17. Los paneles superiores muestran la fluorescencia de la proteína eGFP que había se desplazado en las células; los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas de interferencia diferencial de las células junto con imágenes fluorescentes. Las proteínas de fusión fueron añadidas a las células después de que sus intensidades de fluorescencia se uniformizaran a 10^6 . Cuando se añadieron las proteínas de fusión de las formas modificadas de KSH-1 que mostraban desplazamiento intracelular y eGFP a células CHO, se detectó fluorescencia en las células; se encontró que todas las formas modificadas de KSH-1 retenían la capacidad de desplazar las proteínas de fusión dentro de las células. Comparado con el péptido solo, las proteínas de fusión mostraron diferencias más pequeñas en la eficacia de desplazamiento, pero las proteínas de fusión con KSH1-1, KSH1-7 y KSH1-27 mostraron un desplazamiento intracelular acentuado comparado con KSH1.

Cuando la hidrofobicidad del péptido añadido aumentaba, el desplazamiento intracelular con las proteínas de fusión mostraba una mayor tendencia a no reflejar los resultados con el péptido. Para KSH1-30, que tenía dos triptófanos sustituidos con tirosina, el desplazamiento intracelular disminuía bastante con las proteínas de fusión a pesar de lo cual fueron obtenidos buenos resultados con el péptido; por lo tanto, para la sustitución de dos triptófanos, la isoleucina (KSH1-26) era la más conveniente.

Para el reemplazo de treonina y serina con alanina (KSH1-18, KSH1-20, KSH1-21), no se observó ninguna acentuación clara del desplazamiento intracelular con las proteínas de fusión. Sin embargo, cuando todas las treoninas y serinas se sustituyeron con alanina (KSH1-27), el desplazamiento intracelular tendió a ser acentuado claramente; por lo tanto, se concluyó que para cambiar la eficacia del desplazamiento intracelular de las proteínas de fusión, se requiere un cambio estructural más grande en el resto peptídico que el péptido solo.

En resumen, con la adición de péptidos modificados de KSH1, las proteínas se desplazaban dentro de las células, pero la eficacia del desplazamiento de las proteínas de fusión era diferente a la del péptido solo.

Ejemplo 5 Prueba del desplazamiento intracelular de nuevas secuencias de PTD (SEQ ID NOS:39 a 47 en el listado de secuencia)

Ejemplo 5-1 Selección de nuevas secuencias de PTD por análisis FACS

El péptido KSH1 era una secuencia obtenida de una biblioteca 7 veces concentrada de células Jurkat. A partir de ahí, se recogieron aleatoriamente 1000 IVV contenidos en la biblioteca 7 veces concentrada de células Jurkat, y se identificaron sus secuencias de ADN. Ya que el análisis de KSH1 condujo a la anticipación de que cuando la secuencia del péptido era aplicada a la estructura de rueda, la presencia de un grupo lisina/arginina y el triptófano eran importantes, se realizó un estrechamiento de 1000 secuencias con estas condiciones como criterio. Como consecuencia, 60 secuencias cumplían los criterios. De las 1000 secuencias, se observó una clase de la secuencia que aparece repetidamente. Para estas secuencias, se sintetizaron péptidos fluorescentemente marcados, y se analizaron sus capacidades de desplazamiento dentro de las células.

Cada péptido fue sintetizado, se marcó fluorescentemente, se purificó y se disolvió de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, y se realizó una prueba de desplazamiento intracelular dentro de las células CHO por análisis FACS. Se usó para el control positivo una secuencia PTD derivada del VIH de TAT (SEQ ID NO:51 en el listado de secuencia) y el péptido KSH1; se usó para el control negativo una secuencia peptídica que carece de transferibilidad intracelular (SEQ ID NO:57 en el listado de secuencia).

A consecuencia del análisis FACS, fueron identificados una clase de secuencia que mostraba la misma transferibilidad que KSH1, y nueve clases de secuencias que mostraban la misma transferibilidad que PTD derivado de TAT, en células CHO. Estas nueve clases de secuencias peptídicas son como las mostradas por KSH3 a 10 y KSH2 (SEQ ID NOS:35 a 43 en el listado de secuencia) (FIG. 18).

Ejemplo 5-2 Análisis de transferibilidad celular de las nuevas secuencias de PTD por microscopia confocal

Para KSH2 a KSH10 (SEQ ID NOS:35 a 43 en el listado de secuencia), se realizó una prueba del desplazamiento dentro de las células CHO de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, y se realizó un análisis con microscópico confocal. Se usó para el control positivo una secuencia PTD derivada del TAT de VIH (SEQ ID NO:50 en el listado de secuencia) y el péptido KSH1; se usó para el control negativo una secuencia peptídica que carece de la transferibilidad intracelular (SEQ ID NO:57 en el listado de secuencia).

En el análisis con microscópico confocal, se realizó una corrección de fondo usando células a las cuales había sido añadido el péptido de control negativo (SEQ ID NO:57 en el listado de secuencia). A partir de aquí, se añadió el control positivo péptido de PTDI (SEQ ID NO:50 en el listado de secuencia), y se examinó la fluorescencia en las células.

En cuanto a la nueva secuencia de PTD, cada péptido fue analizado en una serie de diluciones de 2 veces en tres niveles de 50 μ M a 12,5 μ M. Como consecuencia, los resultados del análisis con microscópico confocal mostraron la misma tendencia que los resultados del análisis FACS. Para las cuatro clases de KSH2, KSH3, KSH4, KSH6, KSH7 y KSH10, los resultados del análisis con microscópico confocal, como con el análisis FACS, mostraron mejores perfiles de desplazamiento intracelular que PTDI (FIG. 19, los paneles superiores muestran la fluorescencia de péptidos marcados con fluorescencia desplazados dentro de las células; los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas de interferencia diferencial de las células junto con imágenes fluorescentes; la concentración de adición del péptido fue 25 μ M). Las secuencias candidato de PTD identificadas aquí retuvieron claramente la capacidad de desplazamiento intracelular. Cuando se realizó la búsqueda de base de datos, no fueron observadas ninguna secuencia homóloga; se encontró que todas eran nuevas secuencias PTD. En cuanto a KSH2, el péptido fue localizado como dispersados en la superficie de la membrana celular en las células HeLa, mostrando un modelo de transferibilidad diferente del de los otros PTD.

Ejemplo 5-3 Prueba del desplazamiento intracelular de nuevas secuencias de PTD y proteínas de fusión eGFP en células CHO

Para las seis clases de KSH2, KSH3, KSH4, KSH6, KSH7 y KSH10, se prepararon proteínas de fusión eGFP, y si las secuencias tenían una actividad parecida a PTD las nuevas secuencias de PTD y las proteínas de fusión eGFP en células fue determinado el desplazamiento. Para las proteínas de fusión, fueron elegidas formas moleculares con un estado de solubilización alto. Como consecuencia, para KSH2 y KSH6, fue elegido el tipo molecular C en la FIG. 14, y para las restantes cuatro clases, fue elegido el tipo D en la FIG. 14. Las proteínas de fusión se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 4-1. Las oligo-secuencias de hibridación usadas en este caso son como las que se muestran en la Tabla 3. Se usó para el control negativo EGFP-His; después de que se normalizaran las intensidades de fluorescencia respectivas, fueron añadidas las proteínas de fusión respectivas a las células CHO.

Tabla 5

Nombre del péptido PTD modificado	Oligómero directo (F) u oligómero inverso (R)	SEQ ID NO: en el listado de secuencia
KSH3	F	100
	R	101
KSH4	F	102
	R	103
KSH6	F	104
	R	105
KSH7	F	106

	R	107
KSH10	F	108
	R	109
KSH2	F	110
	R	111

Después de la incubación a 37°C durante 1 hora, se realizó la tripsinización, y las células fueron recuperadas. Después de la operación de lavado, fue determinada la presencia o ausencia del desplazamiento dentro de las células usando un microscopio confocal. En la realización de la medida, se establecieron las condiciones bajo las cuales no se detectó la fluorescencia en células CHO a las cuales había sido añadido el control negativo EGFP-His, después de lo cual fueron realizadas las medidas de las células a las que se les había añadido cada nueva proteína eGFP de fusión de PTD. Como consecuencia, se observó fluorescencia en células CHO a las cuales se había añadido cualquier nueva proteína de fusión de PTD preparada eGFP, demostrando el desplazamiento de las proteínas de fusión dentro de las células.

A partir de este hallazgo, se encontró que las seis clases de nuevas secuencias de PTD tenían la actividad tipo PTD anteriormente descrita. Para el péptido KSH7, los aminoácidos básicos compartidos por los conocidos PTD que han sido publicados hasta ahora, tales como arginina, estaban presentes solos, representando una nueva categoría de PTD. De las seis clases de los nuevo PTD, KSH4 y KSH2 mostraron el desplazamiento más alto dentro de las células que los otros nuevos PTD y el péptido KSH1, y eran útiles cuando se usaba como carga una proteína, en particular, eGFP.

Ejemplo 6 Pruebas de desplazamiento intracelular de péptidos de la secuencia PTD modificados de SEQ ID NO:47 en células CHO

Ejemplo 6-1 Prueba de desplazamiento intracelular de péptidos de la secuencia PTD modificados usando un microscopio confocal

De las nuevas secuencias de PTD encontradas en el Ejemplo 5, el péptido KSH2 es muy capaz de desplazar eGFP dentro de las células; se hizo un intento para modificar el péptido KSH2. Se sintetizaron los péptidos de KSH2-1 a KSH2-4 (SEQ ID NOS:44 a 47 en el listado de secuencia), se marcaron fluorescentemente, se purificaron y se disolvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1-2, se realizó una prueba del desplazamiento dentro de las células CHO, y se realizó un análisis con microscópico confocal.

El péptido KSH2 se caracteriza por la formación de un grupo lisina-arginina en la estructura de rueda y por la presencia de dos triptófanos. Otra característica es que están presentes dos cisteínas como un sándwich de triptófano. A partir de los análisis que han sido realizados hasta ahora, se ha encontrado que son importantes un grupo de aminoácidos básicos y el triptófano. Como consecuencia, en la modificación del péptido KSH2, fue examinada la influencia de la sustitución de dos cisteínas con otros aminoácidos (FIG. 20).

En primer lugar, se examinaron dos casos: se sustituyeron dos cisteínas con alanina (KSH2-1) o con triptófano (KSH2-2). Se sintetizaron los péptidos marcados con FITC, y se examinó su eficiencia de desplazamiento intracelular usando células CHO, HeLa y Jurkat (FIG. 21, la concentración de adición del péptido fue de 50 μ M, 25 μ M o 12,5 μ M).

Como consecuencia, a una concentración de 50 μ M, tanto KSH2-1 como KSH2-2 mostraron un desplazamiento intracelular más alto que KSH2; cuando se diluyó a 25 μ M, KSH2-1 exhibía un desplazamiento intracelular notablemente disminuido. Sin embargo, KSH2-2 mostró una eficacia de desplazamiento intracelular más alta que KSH2 aun cuando se diluía a 25 μ M y 12,5 μ M. En KSH2-2, que mostró un desplazamiento intracelular promovido, el número de triptófanos fue 4. Según el número de triptófanos aumenta, el desplazamiento intracelular del péptido se acentúa; sin embargo, ya que se pensó que esto causaba probablemente insolubilización en la preparación de la proteína de fusión, dos cisteínas fueron sustituidas una tras otra con alanina (KSH2-3 y KSH2-4), y el desplazamiento intracelular fue examinado. Cuando se examinó la capacidad de desplazamiento intracelular de los péptidos marcados con FITC en células CHO, HeLa, y Jurkat, se encontró que en ambos casos, la capacidad del desplazamiento intracelular se acentuaba, comparado con KSH2.

Ejemplo 6-2 Prueba del desplazamiento intracelular de las proteínas de fusión de secuencias PTD modificadas y eGFP en células CHO

Para KSH2-3 y KSH2-4 (SEQ ID NOS:46 y 47 en el listado de secuencia), se prepararon las proteínas de fusión eGFP, y se compararon las capacidades de transferencia de KSH2 y de las proteínas de fusión eGFP en términos de actividad del tipo PTD respecto al desplazamiento de las nuevas secuencias de PTD y de las proteínas de fusión

eGFP en las células. Las proteínas de fusión preparadas eran del tipo C en la FIG. 14 para KSH2 y del tipo D en la FIG. 14 para KSH2-3 y KSH2-4. Las proteínas de fusión se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 4-1. Las oligo-secuencias de hibridación usadas en esta invención son como se muestran en la Tabla 4.

Tabla 6

Nombre del péptido PTD modificado	Oligómero directo (F) u oligómero inverso (R)	SEQ ID NO: en el listado de secuencia
KSH2-3	F	112
	R	113
KSH4	F	114
	R	115

5

Cuando se examinó la capacidad de desplazamiento en las células CHO, el desplazamiento en las células fue confirmado tanto para las proteínas de fusión de KSH2-3 como para KSH2-4 con eGFP. En cuanto a la eficacia del desplazamiento intracelular, la capacidad de desplazamiento fue más baja que la de la proteína de fusión eGFP con el péptido KSH2, pero era equivalente a la del PTDI derivado de TAT.

10 En resumen, se concluyó que es eficiente elegir KSH2 cuando se usa como carga una proteína polimérica, y elegir las formas modificadas KSH2-3 y KSH2-4 cuando se usan sustancias de bajo peso molecular como los péptidos.

Aplicabilidad Industrial

Según la presente invención, es posible proporcionar un péptido que penetra en las células que tiene una nueva secuencia de aminoácidos y un producto farmacéutico que contiene el péptido. Esta aplicación reivindica la prioridad según la solicitud de patente japonesa N°. 2005-314355.

15

Listado de secuencias

<110> MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION

<120> NUEVO PÉPTIDO QUE PENETRA EN LAS CÉLULAS

<130> MP5209WO

20 <150> JP2005-314355

<151> 2005-10-28

<160> 119

<170> Patent In versión 3.1

<210> 1

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inventor: Uno, Shusei; Kamide, Kaeko; Nakakubo, Hiroshi

30 <220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 1

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

35 <210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 2

Lys Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Ala Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

5 <210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 3

Lys Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Ala Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 4

Lys Leu Trp Met Arg Trp Trp Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 5

Arg Leu Trp Met Arg Trp Trp Ser Ala Thr Thr Arg Ala Tyr Gly
1 5 10 15

30 <210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

35 <400> 6

Lys Leu Ala Met Arg Ala Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 7

Lys Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Trp Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

5 <210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 8

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Trp Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 9

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Trp Thr Arg Arg Trp Gly
1 5 10 15

20 <210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 10

Ala Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

30 <210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

35 <400> 11

Arg Ala Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 12

Arg Leu Ala Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 13

Arg Leu Trp Ala Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 14

Arg Leu Trp Met Ala Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

20

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

25

<400> 15

Arg Leu Trp Met Arg Ala Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

30

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 16

Arg Leu Trp Met Arg Trp Ala Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

35

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 17

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ala Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 18

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Gly Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

10 <210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 19

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Ala Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 20

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Ala Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

25 <210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 21

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Ala Arg Tyr Gly
1 5 10 15

35 <210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

40 <400> 22

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Ala Gly
1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 23

Arg Leu Leu Met Arg Leu Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

10 <210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 24

Arg Leu Phe Met Arg Phe Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 25

Arg Leu Ile Met Arg Ile Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

25

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 26

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ala Pro Ala Ala Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

35

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

40 <400> 27

Arg Leu Ile Met Arg Ile Tyr Ala Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

- 5 <210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 28

Arg Leu Val Met Arg Val Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

- 10 <210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 29

Arg Leu Tyr Met Arg Tyr Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

- 20 <210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 30

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Arg Thr Arg Ala Tyr Gly
1 5 10 15

- 25 <210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 31

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Ala Arg Gly
1 5 10 15

- 35 <210> 32
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

40 <400> 32

Arg Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Ala
1 5 10

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 33

Lys Leu Trp Met Arg Trp Tyr Ser Pro Thr Thr Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

10 <210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 34

Gly Tyr Arg Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Trp Arg Met Trp Leu Arg
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD (Dominio de transducción de la proteína)

<400> 35

Ile Pro Ser Arg Trp Lys Asp Gln Phe Trp Lys Arg Trp His Tyr
1 5 10 15

25

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 36

Lys Asn Ala Trp Lys His Ser Ser Cys His His Arg His Gln Ile
1 5 10 15

35 <210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

40 <400> 37

Arg Val Arg Glu Trp Trp Tyr Thr Ile Thr Leu Lys Gln Glu Ser
1 5 10 15

- 5 <210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 38

Leu Ile Thr Lys Gln Tyr Arg Tyr Pro Ser Arg Arg Arg Phe Asn
1 5 10 15

- 10 <210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 39

Gln Gln His Leu Leu Ile Ala Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Tyr Asn
1 5 10 15

- 20 <210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 40

Gly Tyr Gly Asn Cys Arg His Phe Lys Gln Lys Pro Arg Arg Asp
1 5 10 15

- 25 <210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 41

Arg Thr Leu Val Asn Glu Tyr Lys Asn Thr Leu Lys Phe Ser Lys
1 5 10 15

- 35 <210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

40 <400> 42

Lys Arg Pro Thr Met Arg Phe Arg Tyr Thr Trp Asn Pro Met Lys
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 43

Trp Lys Cys Arg Arg Gln Cys Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

10 <210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 44

Trp Lys Ala Arg Arg Gln Ala Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 45

Trp Lys Trp Arg Arg Gln Trp Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

25 <210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 46

Trp Lys Ala Arg Arg Gln Cys Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

<210> 47

35 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

40 <400> 47

Trp Lys Cys Arg Arg Gln Ala Phe Arg Val Leu His His Trp Asn
1 5 10 15

- 5 <210> 48
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia diseñada basándose en PTD(Dominio de transducción de la proteína)
- 15 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (6) .. (6)
<223> n representa cualquier base
- 15 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (15).. (15)
<223> n representa cualquier base
- 20 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (24) .. (24)
<223> n representa cualquier base
- 25 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (27).. (27)
<223> n representa cualquier base
- 25 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (30) .. (30)
<223> n representa cualquier base
- 30 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (33) .. (33)
<223> n representa cualquier base
- 35 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (36) .. (36)
<223> n representa cualquier base
- 40 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (39).. (39)
<223> n representa cualquier base
- 40 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (45) .. (45)
<223> n representa cualquier base
- 45 <400> 48
aaryntgga tgmgttgga ywsnccnacb acnmgnmgnt ayggn 45
- 50 <210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Secuencia diseñada basándose en PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (3) .. (3)
 <223> n representa cualquier base

5

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (9) .. (9)
 <223> n representa cualquier base

10

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12).. (12)
 <223> n representa cualquier base

15

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (15).. (15)
 <223> n representa cualquier base

20

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (18).. (18)
 <223> n representa cualquier base

25

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (24).. (24)
 <223> n representa cualquier base

30

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (33) .. (33)
 <223> n representa cualquier base

35

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (42).. (42)
 <223> n representa cualquier base

<400> 49
 ggntaymgnm gnacnacncc nwsntaytgg mgnatgtggy tnaar

45

<210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

45

<400> 50

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 51

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Pro Pro Gln
1 5 10

5 <210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 52
gccatggtga gcaagggcga ggagctgttc 30

15 <210> 53
<211> 70
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 53

caccgcggcg acgttgtcgt cgtttcttcc tgcgtagga tccccctccc ttgtacagct 60
cgtccatgcc 70

20 <210> 54
<211> 69
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador

<400> 54

cgctcagcgt cgactcaccg gtgatgatgg tggatgatgac tcgagccgcc accgcggcga 60
cgtttgtcgt 69

30 <210> 55
<211> 88
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

35 <400> 55

aagccatggg aggggatcc tacggcagga agaaacgacg acaacgtcgc cgcggtggcg 60
gctcgagtat ggtgagcaag ggcgagga 88

40 <210> 56
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 56

ccgctcagcg tcgactcacc cgtgatgatg gtggatgatga gaaccaccac ccttgtacag 60

ctcgtccatg cc 72

5 <210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido diseñado para actuar como PTD(Dominio de transducción de la proteína)

<400> 57

Tyr Asn Arg Thr Asn Arg Arg Gly Gln Ala Arg Lys Asp Asp Ser
1 5 10 15

<210> 58

<211> 59

15 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA para reasociación

<400> 58

20 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggcgagta ccatcgcatc cacaacttg 59

<210> 59

<211> 59

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> DNA para reasociación

<400> 59

gatccaagtt gtggatgcga tggactcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc 59

<210> 60

30 <211> 59

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA para reasociación

35 <400> 60

gatccaggtt gtggatgcga tggactcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc 59

<210> 61

<211> 59

<212> DNA

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA para reasociación

<400> 61

tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggcgagta ccatcgcatc cacaacttg 59

45 <210> 62

<211> 59

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
5	<400> 62 gatccaagtt gtggatgcga tggactcgg caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 63	
	<211> 59	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 63 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttgccgagta ccatcgcatc cacaacttg	59
15	<210> 64	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> DNA para reasociación	
	<400> 64 gatccaagtt gtggatgcga tggactcgc caactactcg tgcatacgga ggtggcggc	59
	<210> 65	
	<211> 59	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
30	<400> 65 tcgagccgcc acctccgtat gcacgagtag ttggcgagta ccatcgcatc cacaacttg	59
	<210> 66	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 66 gatccaagtt gtggatgcga tgggtgtcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 67	
40	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
45	<400> 67 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggcgacca ccatcgcatc cacaacttg	59
	<210> 68	
	<211> 59	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 68		
	tcgagccgcc acctccgtat gcacgagtag tggccgacca ccatcgcatc cacaacctg	59	
5	<210> 69		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 69		
	gatccaggtt gtgatgcga tgggtgctcg ccactactcg tgcatacgga ggtggcggc	59	
	<210> 70		
15	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
20	<400> 70		
	tcgagccgcc acctccgtat gcacgagtag ttggcgagta agctcgcata gccaaactg	59	
	<210> 71		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 71		
	gatccaagtt ggctatgcga gcttactcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59	
	<210> 72		
30	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
35	<400> 72		
	tcgagccgcc acctccgtat gcacgagtcc aaggcgagta ccatcgcatc cacaactg	59	
	<210> 73		
	<211> 59		
40	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 73		
	gatccaagtt gtgatgcga tgggtactcgc cttggactcg tcgatacgga ggtggcggc	59	
45	<210> 74		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> DNA para reasociación		

	<400> 74 gatccagggtt gtggatgcga tggactcgc cctggactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
5	<210> 75 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> DNA para reasociación	
10	<400> 75 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtc agggcgagta ccatcgcatc cacaacctg	59
	<210> 76 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> DNA para reasociación	
	<400> 76 gatccagggtt gtggatgcga tggactcgc cctggactcg tcgatgggga ggtggcggc	59
20	<210> 77 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> DNA para reasociación	
25	<400> 77 tcgagccgcc acctcccat cgacgagtc agggcgagta ccatcgcatc cacaacctg	59
	<210> 78 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> DNA para reasociación	
	<400> 78 gatccaagtt gtggatgcga tggactcgg gaactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
35	<210> 79 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> DNA para reasociación	
40	<400> 79 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttcccgagta ccatcgcatc cacaacttg	59
	<210> 80 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> DNA para reasociación	
50	<400> 80 gatccaagtt ggctatgcga tggactcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59

	<210> 81	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 81	
	tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggcgagta ccatcgcata gccaaactg	59
10	<210> 82	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
15	<400> 82	
	gatccagggt gtggatgcga tggtagctc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 83	
	<211> 59	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 83	
	tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggagcgta ccatcgcatc cacaacctg	59
25	<210> 84	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> DNA para reasociación	
	<400> 84	
	gatccagggt gtggatgcga tggtagctc cagccactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 85	
	<211> 59	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 85	
40	tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtgg ctggcgagta ccatcgcatc cacaacctg	59
	<210> 86	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 86	
	gatccagggt gtggatgcga tggtagctc caactgctcg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 87	
50	<211> 59	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
5	<400> 87 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagcag ttggcgagta ccatcgcatc cacaacctg	59
	<210> 88	
	<211> 59	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 88 gatccagggt gattatgcga atctactcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
15	<210> 89	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> DNA para reasociación	
	<400> 89 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggcgagta gattcgcata atcaacctg	59
	<210> 90	
	<211> 59	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
30	<400> 90 gatccagggt gtggatgcga tggtagctc cagctgctg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 91	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 91 tcgagccgcc acctccgtat cgacgagcag ctggagcgta ccatcgcatc cacaacctg	59
	<210> 92	
40	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
45	<400> 92 gatccagggt gatcatgcga atctacgctc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59
	<210> 93	
	<211> 59	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 93		
	tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggagcgta gattcgcatg atcaacctg	59	
5	<210> 94		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 94		
	gatccaggtt gtatatgcga tattactcgc caactactcg tcgatacgga ggtggcggc	59	
	<210> 95		
	<211> 59		
15	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 95		
20	tcgagccgcc acctccgtat cgacgagtag ttggcgagta atatcgcata tacaacctg	59	
	<210> 96		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 96		
	gatccaggtt gtgatgcga tggactcgc cacggactcg tgcctacgga ggtggcggc	59	
	<210> 97		
	<211> 59		
30	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 97		
35	tcgagccgcc acctccgtat gcacgagtc gtggcgagta ccatcgcatc cacaacctg	59	
	<210> 98		
	<211> 59		
	<212> DNA		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> DNA para reasociación		
	<400> 98		
	gatccggata ccgacgcacg acccgcctct actggagaat gtggctcagg ggtggcggc	59	
	<210> 99		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> DNA para reasociación		

	<400> 99 tcgagccgcc acccctgagc cacattctcc agtaggacgg ggtcgtgcgt cggtatccg	59
5	<210> 100 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> DNA para reasociación	
10	<400> 100 gatccattcc gtgcgctgg aaggaccaat tctggaagcg gtggcactac ggtggcggc	59
	<210> 101 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> DNA para reasociación	
	<400> 101 tcgagccgcc accgtagtgc caccgctcc agaattggc cttccagcgc gacggaatg	59
20	<210> 102 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> DNA para reasociación	
25	<400> 102 gatccaagaa cgcattgaaa cattcgagct gccatcacgc tcatcaaac ggtggcggc	59
	<210> 103 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> DNA para reasociación	
	<400> 103 tcgagccgcc accgatttga tgacggtgat ggcagctcga atgtttccat gcgttctg	59
35	<210> 104 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> DNA para reasociación	
40	<400> 104 gatccctcat cacgaagcag tacagatacc cgtccagacg acggtttaac ggtggcggc	59
	<210> 105 <211> 59 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> DNA para reasociación	
50	<400> 105 tcgagccgcc accgttaaac cgtcgtctgg acgggtatct gtactgctc gtgatgagg	59

	<210> 106	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 106	
	gatcccagca acatctgctc atcgcaatca acggataccc acgatacaat ggtggcggc	59
10	<210> 107	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
15	<400> 107	
	tcgagccgcc accattgtat cgtgggtatc cgttgattgc gatgagcaga tgttgctgg	59
	<210> 108	
	<211> 59	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 108	
	gatccaagcg accaacgatg cgattccgat acacatggaa tcctatgaag ggtggcggc	59
25	<210> 109	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> DNA para reasociación	
	<400> 109	
	tcgagccgcc acccttcata ggattccatg tgtatcggaa tcgcatcggt ggtcgcttg	59
	<210> 110	
	<211> 59	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 110	
40	gatcctggaa gtgccgtgc caatgcttc gtgtactgca tcattggaat ggtggcggc	59
	<210> 111	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 111	
	tcgagccgcc accattccaa tgatgcagta cacggaagca ttggcgacgg cacttcag	59
	<210> 112	
50	<211> 59	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
5	<400> 112 gatcctggaa ggcgcgtcgc caatgcttc gtgtactgca tcattggaat ggtggcggc	59
	<210> 113	
	<211> 59	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
	<400> 113 tcgagccgcc accattcaa tgatgcagta cacggaagca ttggcgacgc gccttcag	59
15	<210> 114	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> DNA para reasociación	
	<400> 114 gatcctggaa gtgcgcgtcgc caagcttcc gtgtactgca tcattggaat ggtggcggc	59
	<210> 115	
25	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA para reasociación	
30	<400> 115 tcgagccgcc accattcaa tgatgcagta cacggaaagc ttggcgacgg cacttcag	59
	<210> 116	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 116	
	catgcatgg atgggagggt cccatcacca ccatcatcac ggaggtatgg tgagcaaggg	60
	cgaggagctg	70
40	<210> 117	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 117 29 gcggatcccg gccgctttac ttgtacagc	
	<210> 118	
	<211> 75	

ES 2 377 660 T3

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

5 <400> 118

```

      .....
tggatgcgtt ggtacagccc tactacgogt aggtacggag gacatatggg catggtgagc 60
aagggcgagg agctg 75

```

<210> 119
<211> 78
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador

<400> 119

```

gccatgggag ggtcccatca ccaccatcat cacggtaccg gaaagttgtg gatgcgttgg 60
tacagcccta ctacgcgt 78

```

15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido
(I) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada más abajo:
B-X-Z-X-Arg-Z-Tyr-J-X-O¹-X-Arg-O²-X-X o X-X-O¹-Arg-X-O²-X-J-Tyr-Z-Arg-X-Z-X-B,
5 en el que (i) B es arginina o lisina, (ii) al menos uno de O¹ u O² es arginina, (iii) Z es un aminoácido hidrófobo, (iv) J es serina o alanina, y (v) X es un aminoácido elegido aleatoriamente; o
(II) que tiene uno o varios aminoácidos elegidos aleatoriamente en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos definida en (I), a condición de que sea capaz de transportar proteínas dentro de las células y/o dentro de los núcleos.
- 10 2. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de las SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencias en el que uno o dos aminoácidos han sido sustituidos, delecionados, añadidos o insertados, y su péptido de cadena invertida, cuyo péptido tiene la capacidad de desplazarse en las células.
3. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de las SEQ ID NOS:1 a 47 en el listado de secuencia, y su péptido de cadena invertida.
- 15 4. Un ADN que consiste en la secuencia de ADN que codifica el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector recombinante que contiene el ADN de la reivindicación 4.
6. Un transformante que comprende del vector recombinante de la reivindicación 5.
7. Una sustancia unida al péptido que incluye el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y, unida a éste, una sustancia biológicamente activa.
- 20 8. La sustancia unida al péptido de la reivindicación 7, en el que la sustancia biológicamente activa es una proteína que tiene actividad biológica, un polipéptido que tiene actividad biológica, un fármaco encapsulado por un liposoma, un liposoma que encapsula a un fármaco polietilenglicolado, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico, una perla magnética, una nanopartícula o un fago.
- 25 9. La sustancia unida al péptido de la reivindicación 7, en el que la proteína que tiene actividad biológica es una proteína de aproximadamente 10 KDa a aproximadamente 120 KDa o un polipéptido que tiene de 4 a 30 aminoácidos.
10. La sustancia unida al péptido de la reivindicación 7, en el que la proteína que tiene actividad biológica es el factor de transcripción MI (MITF).
- 30 11. La sustancia unida al péptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que es transportada dentro de las células y/o dentro de los núcleos.
12. La sustancia unida al péptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que es transportada dentro de las células.
13. Un producto farmacéutico que contiene la sustancia unida al péptido de la reivindicación 7.
14. El producto farmacéutico de la reivindicación 13, que se usa como fármaco antialérgico.

FIG. 1

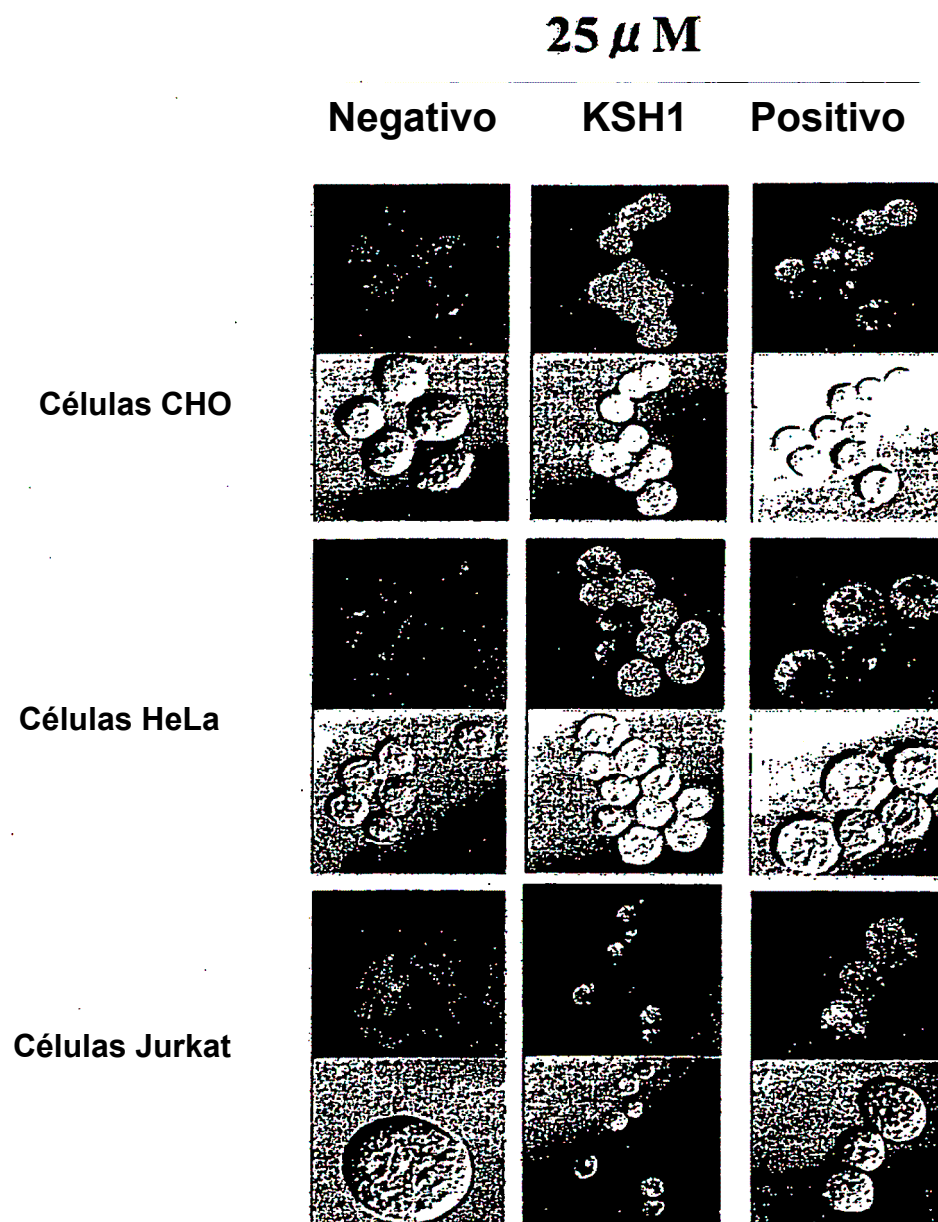


FIG. 2

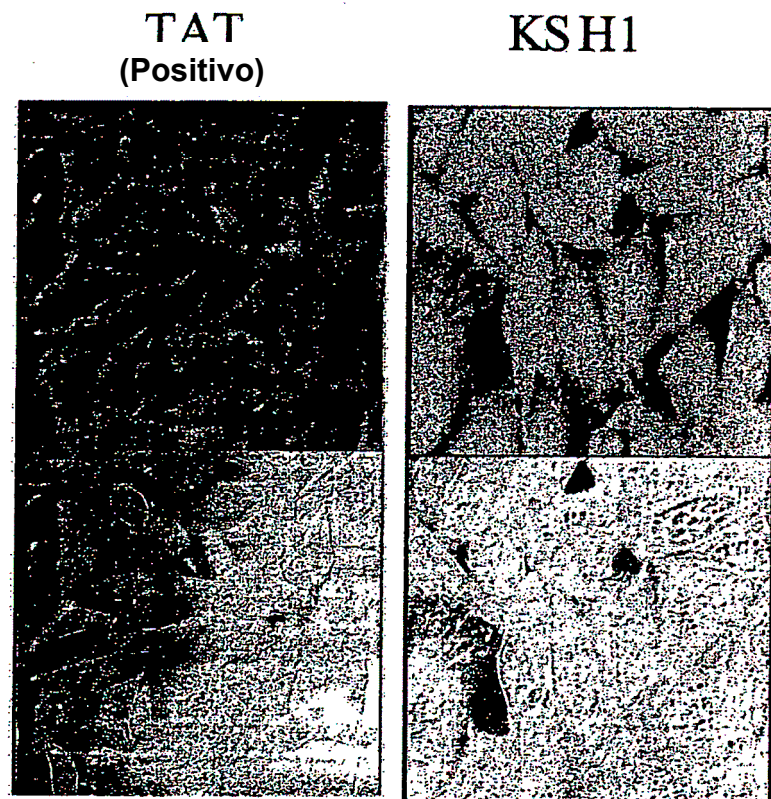


FIG. 3

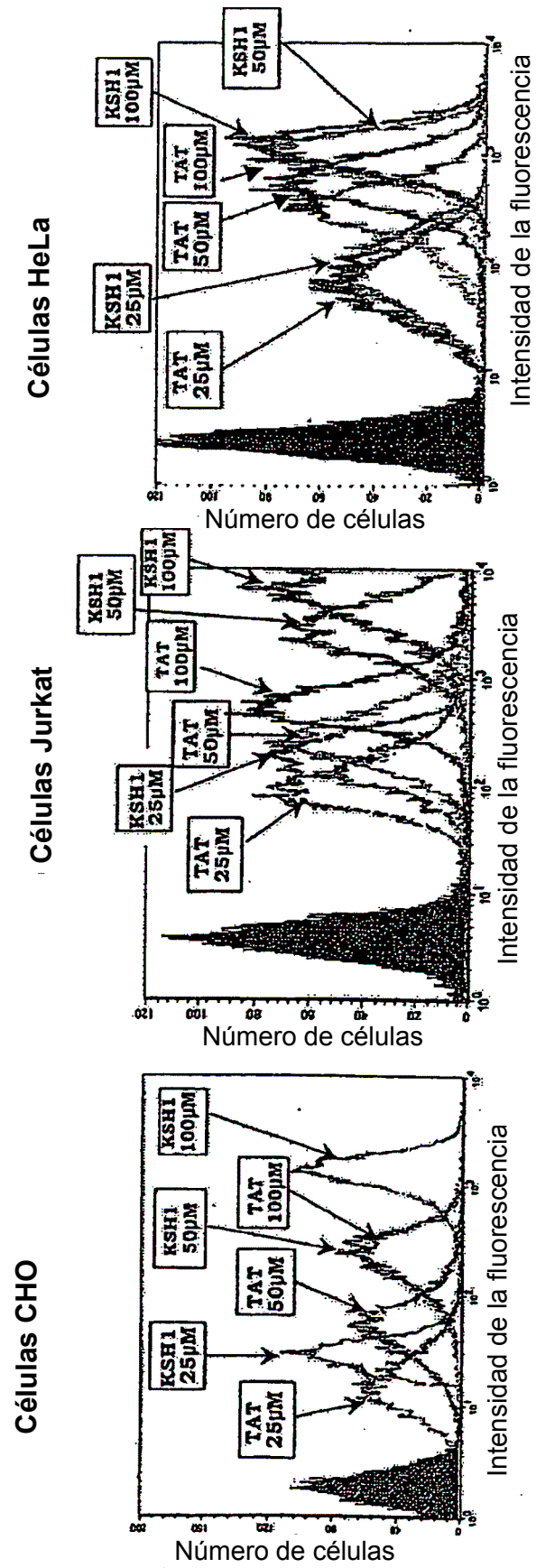


FIG. 4

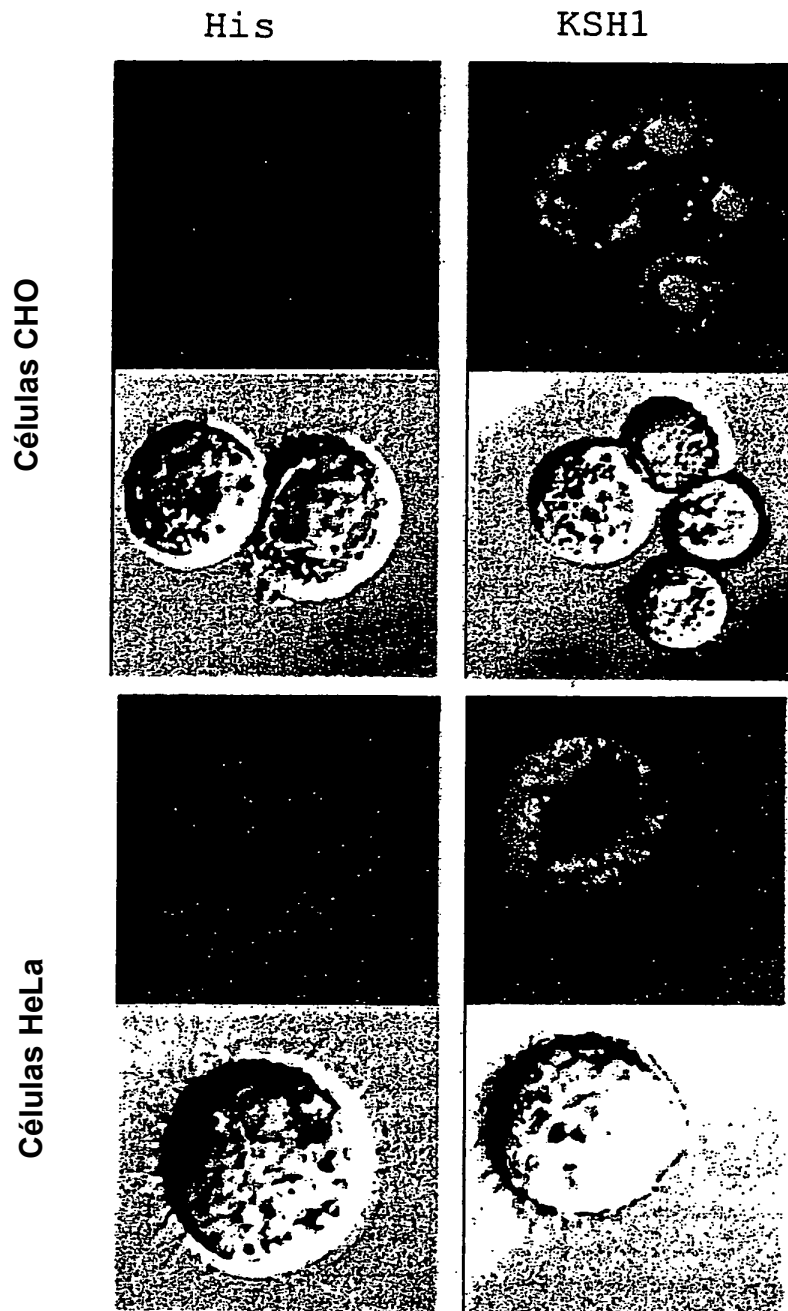


FIG. 5

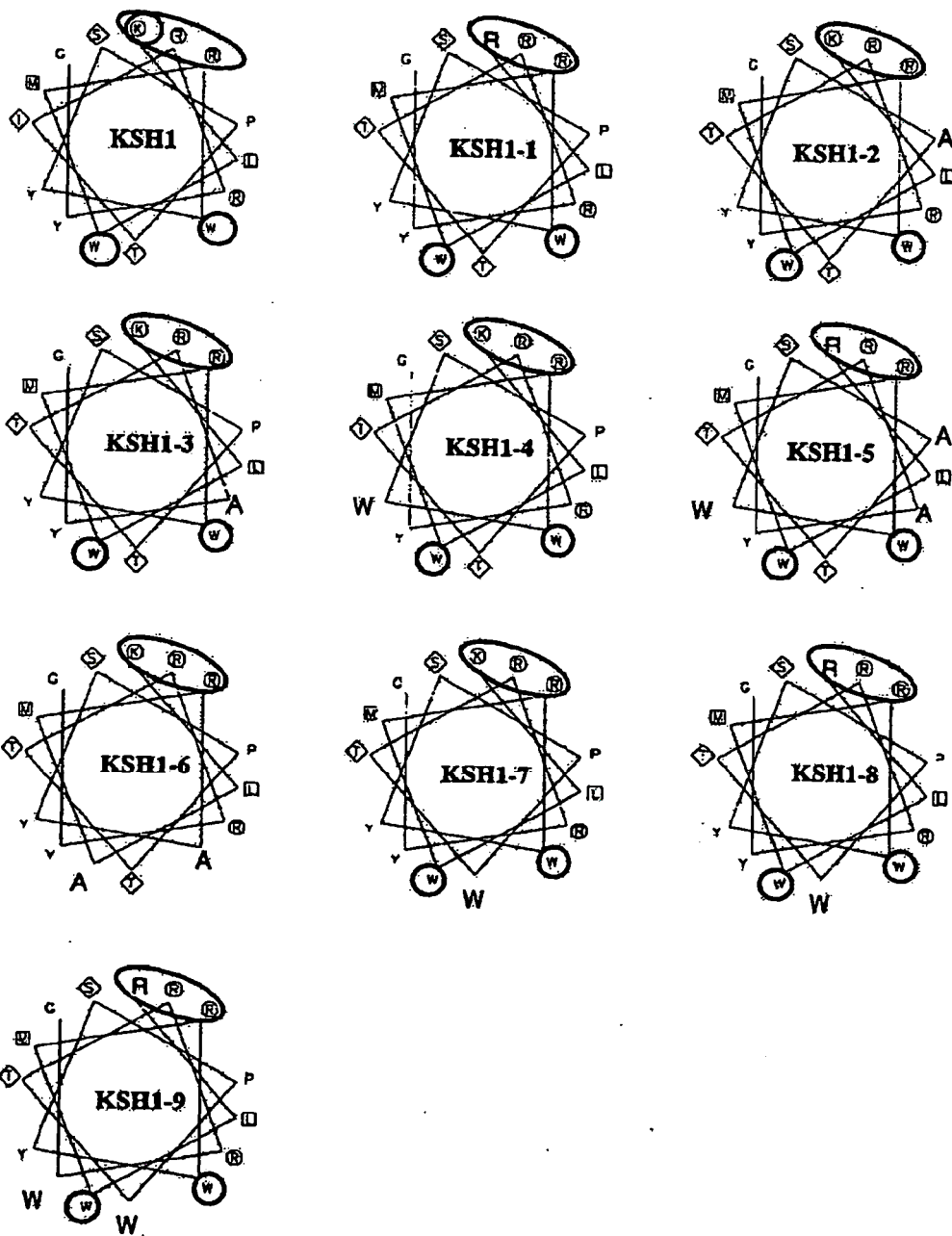
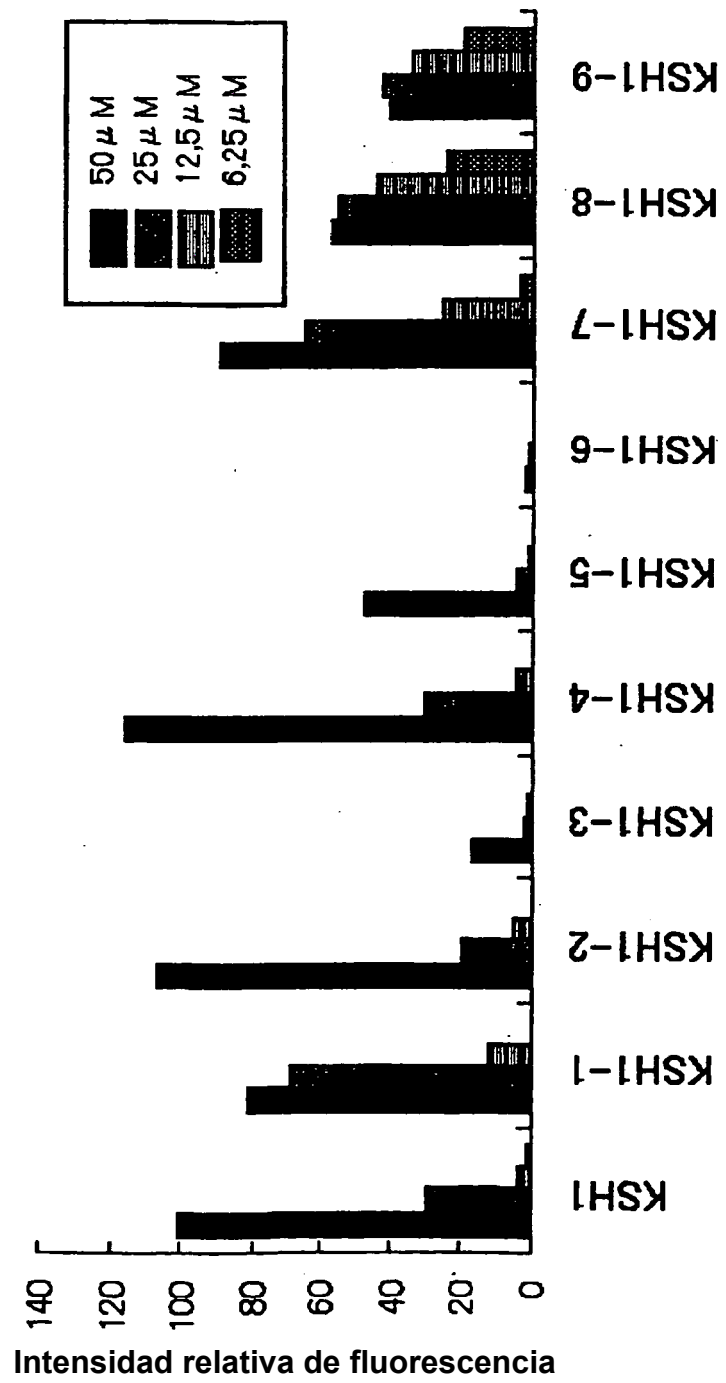


FIG. 6



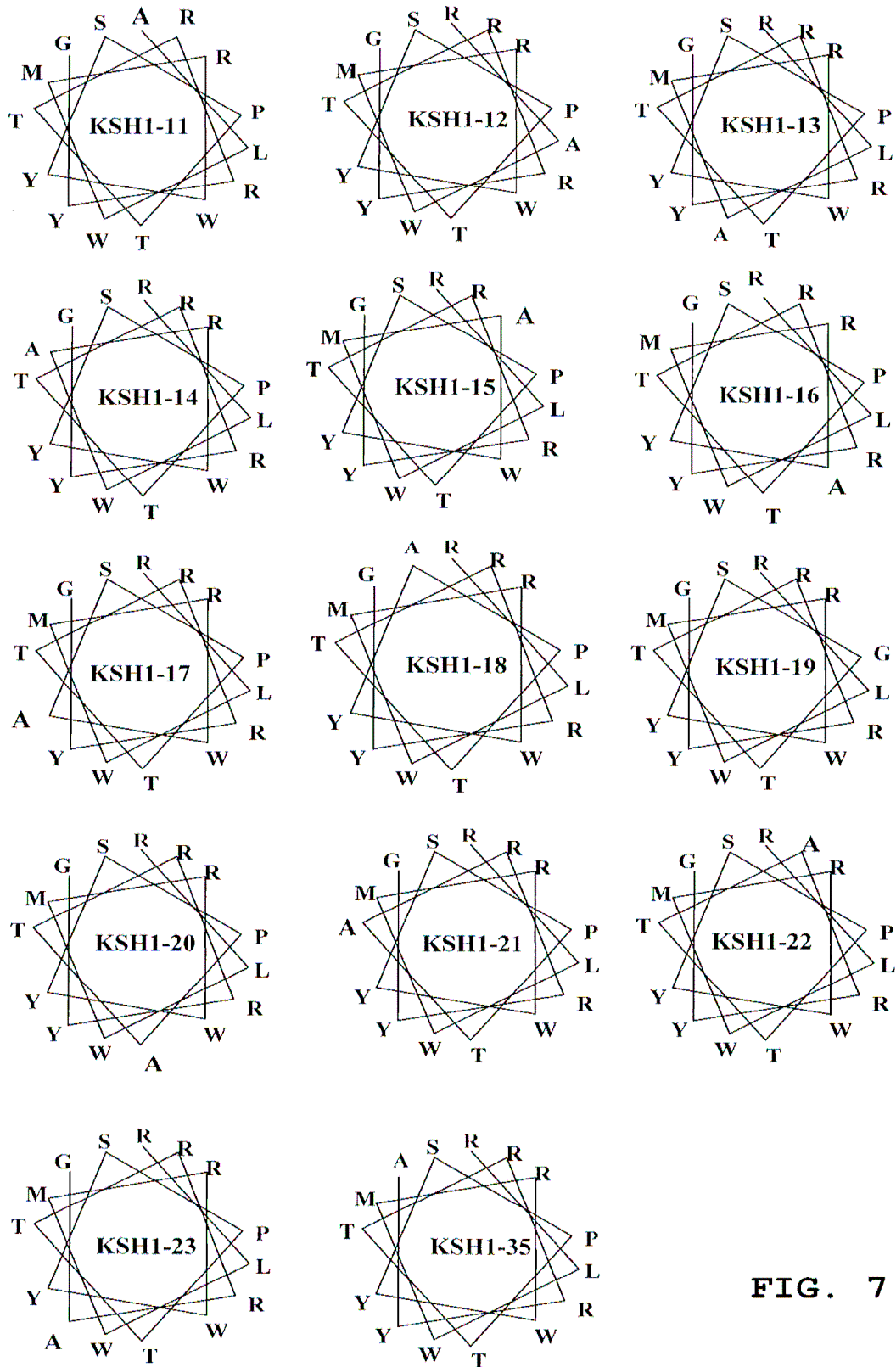


FIG. 7

FIG. 8

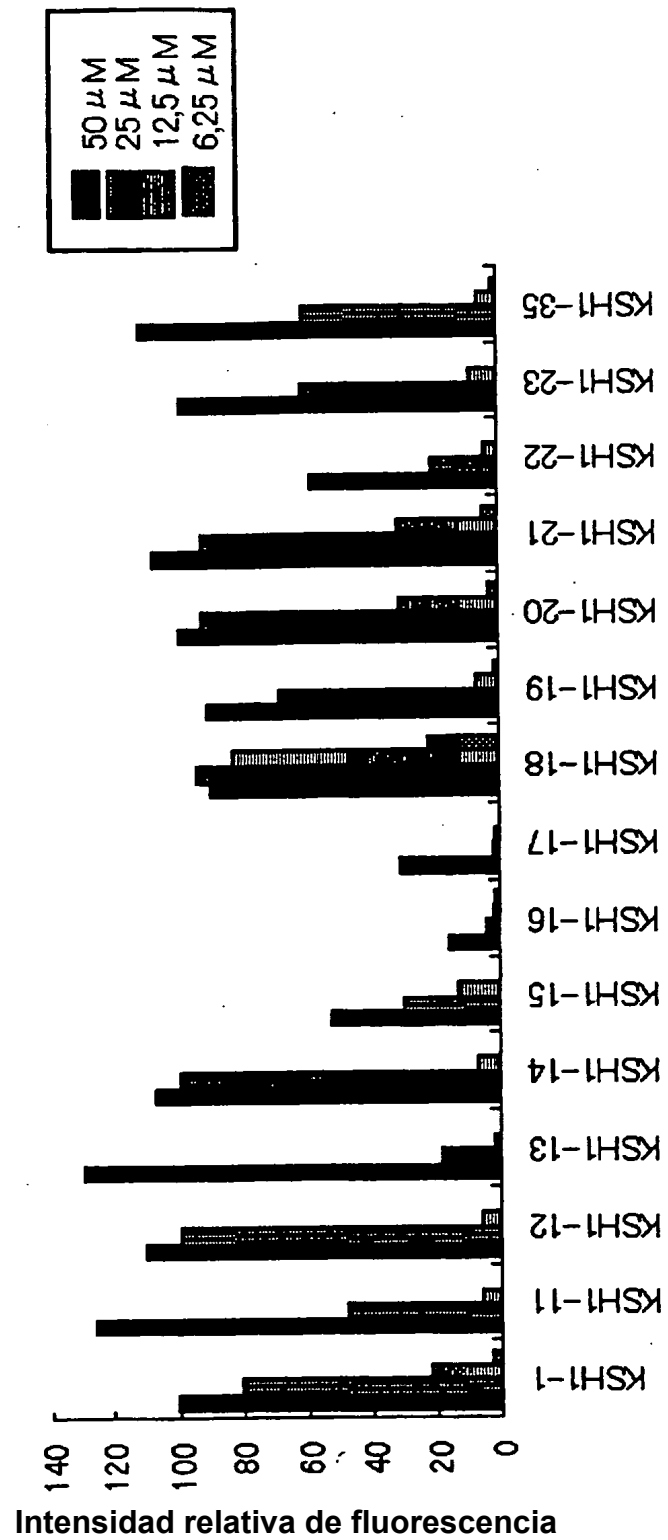


FIG. 9

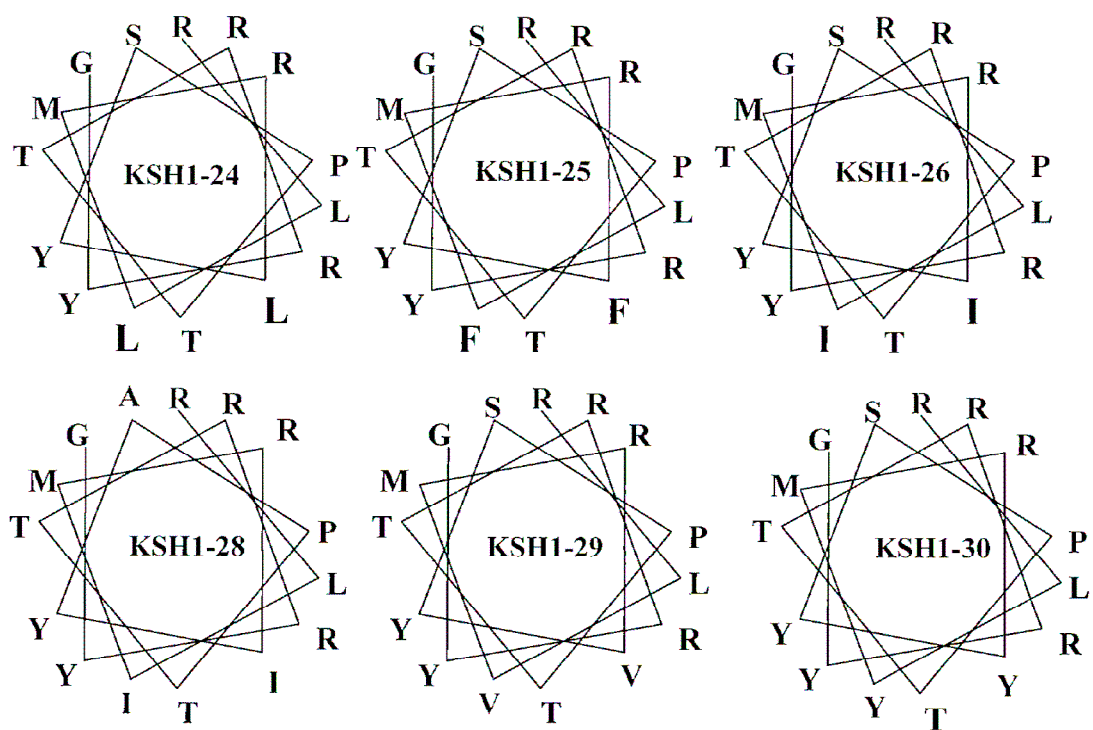


FIG. 10

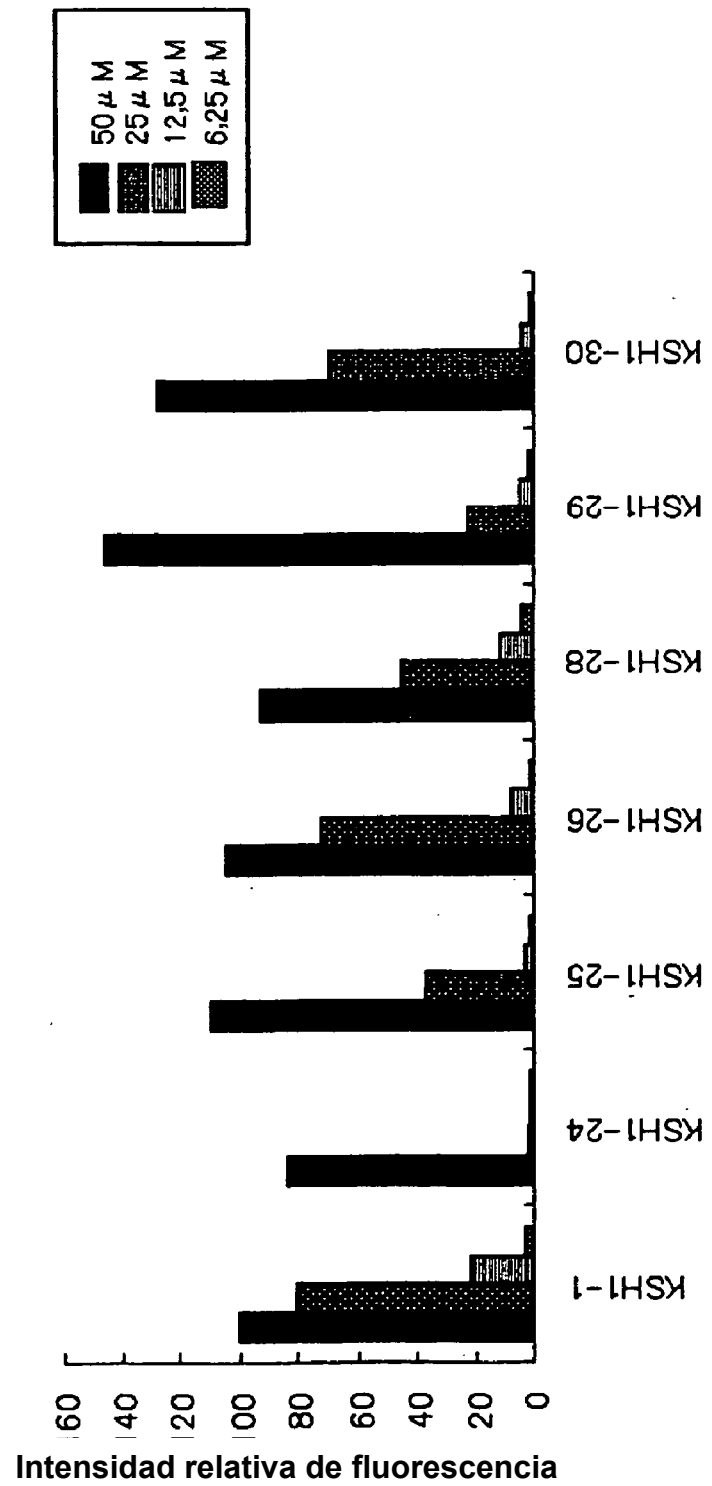


FIG. 11

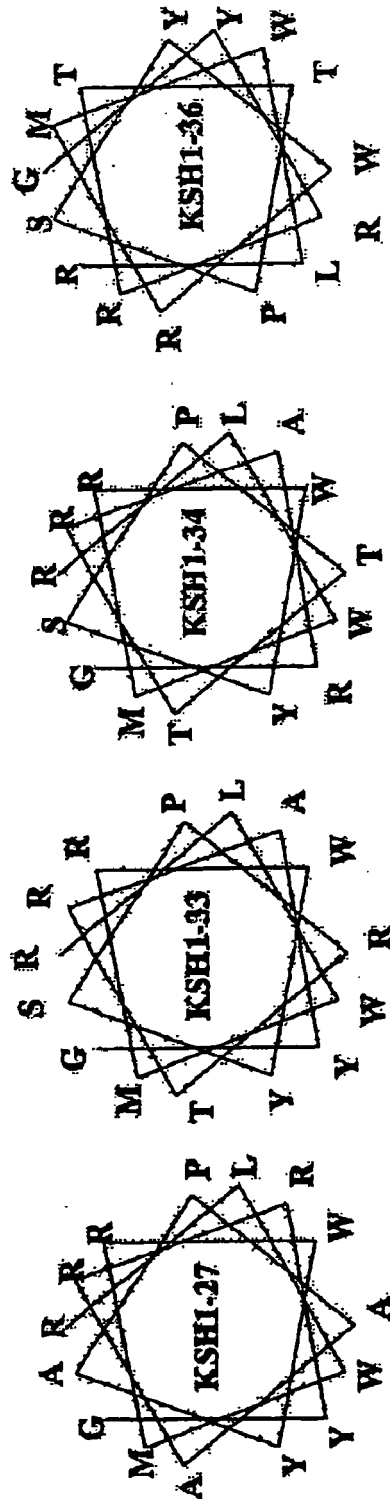


FIG. 12

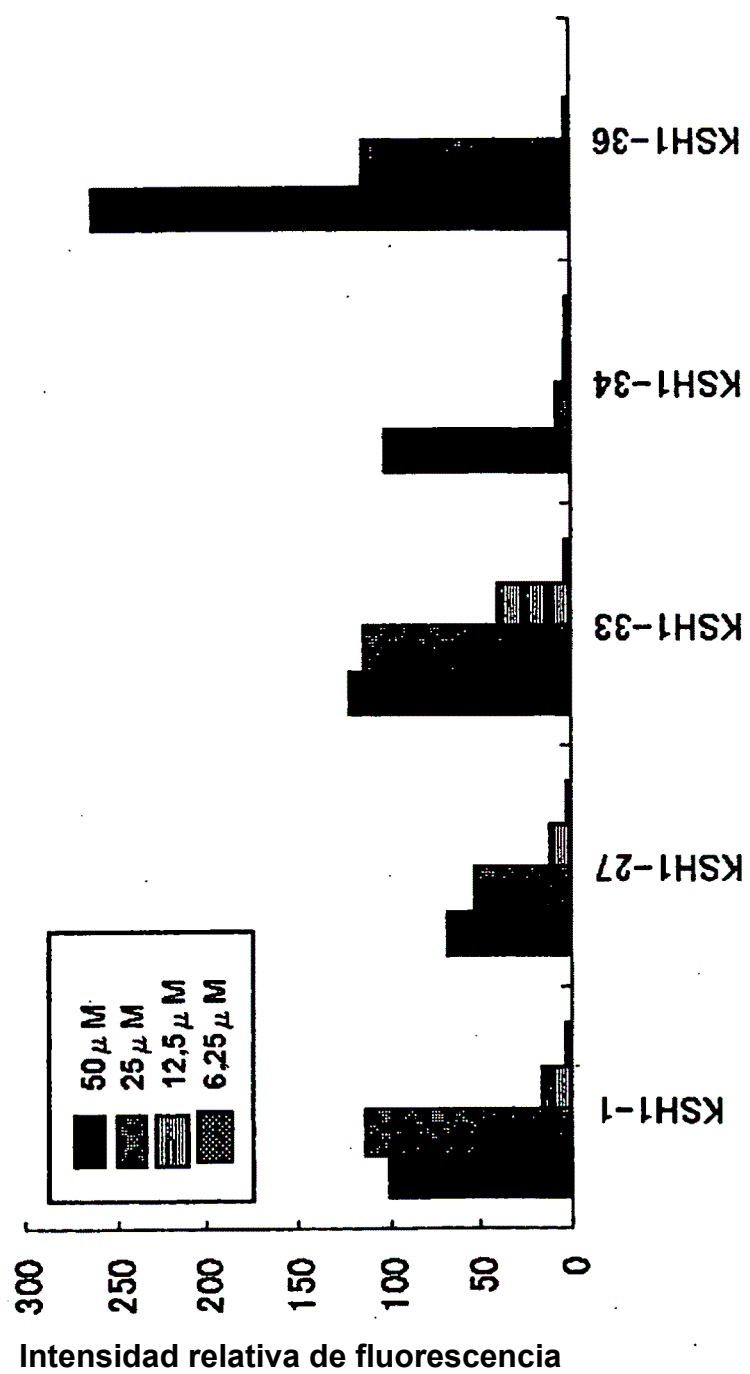
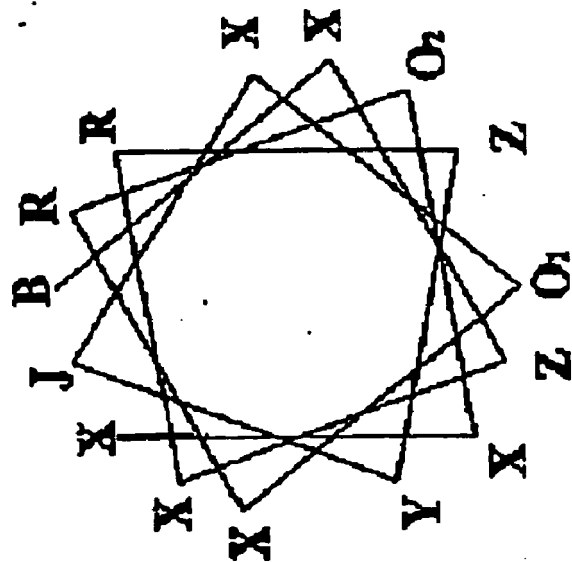


FIG. 13



B	X	Z	X	R	Z	Y	J	X	O ₁	X	R	O ₂	X	X
B: Arg o Lys J: Ser o Ala Z: aminoácido hidóforo O bien O ₁ o bien O ₂ es R														

FIG. 14

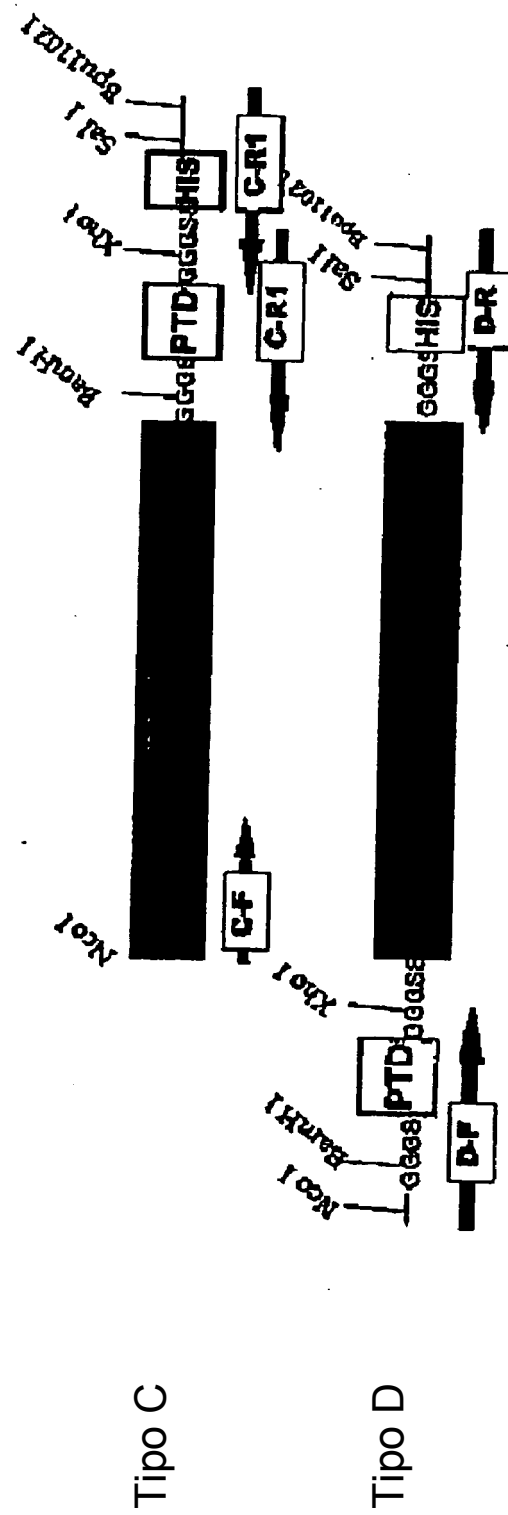


FIG. 15

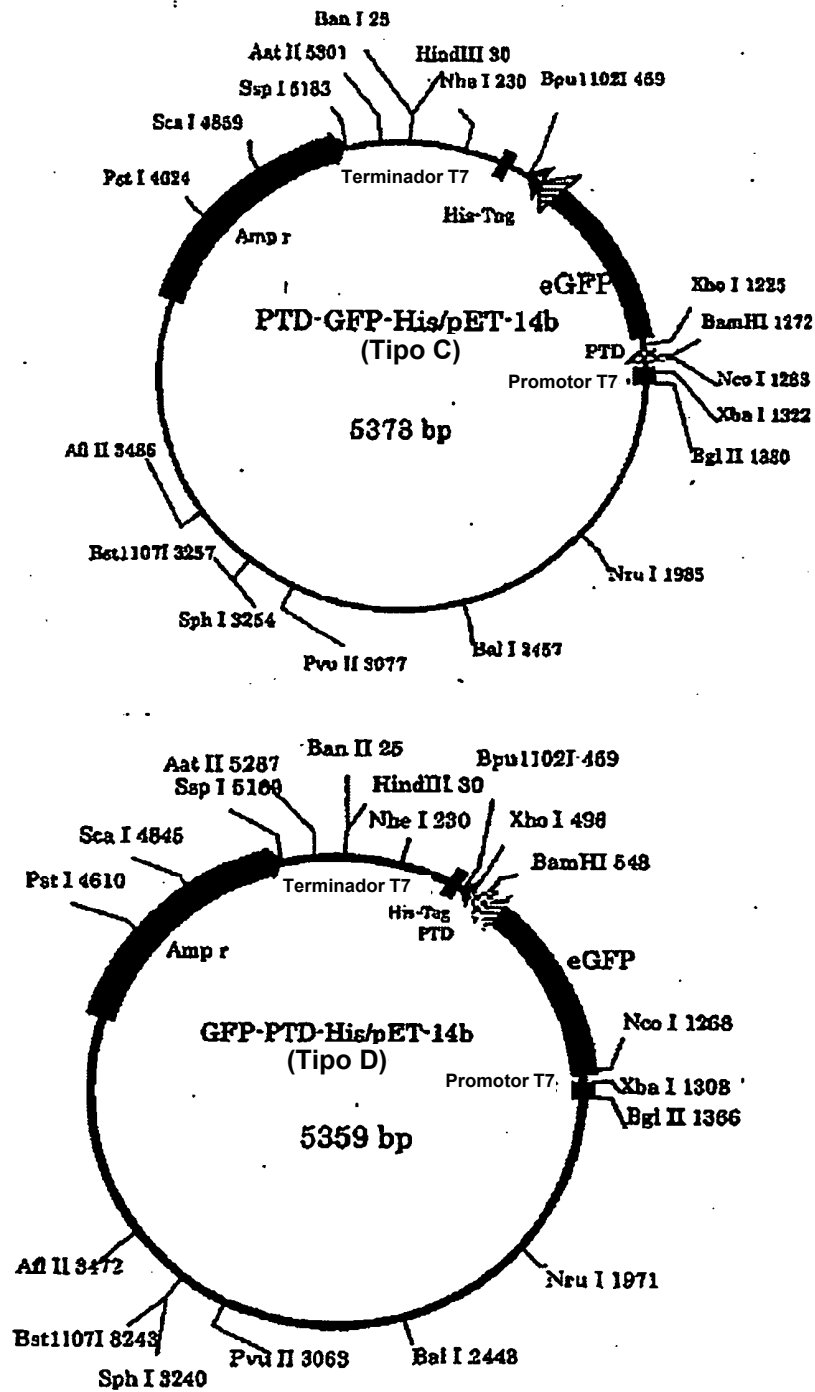


FIG. 16

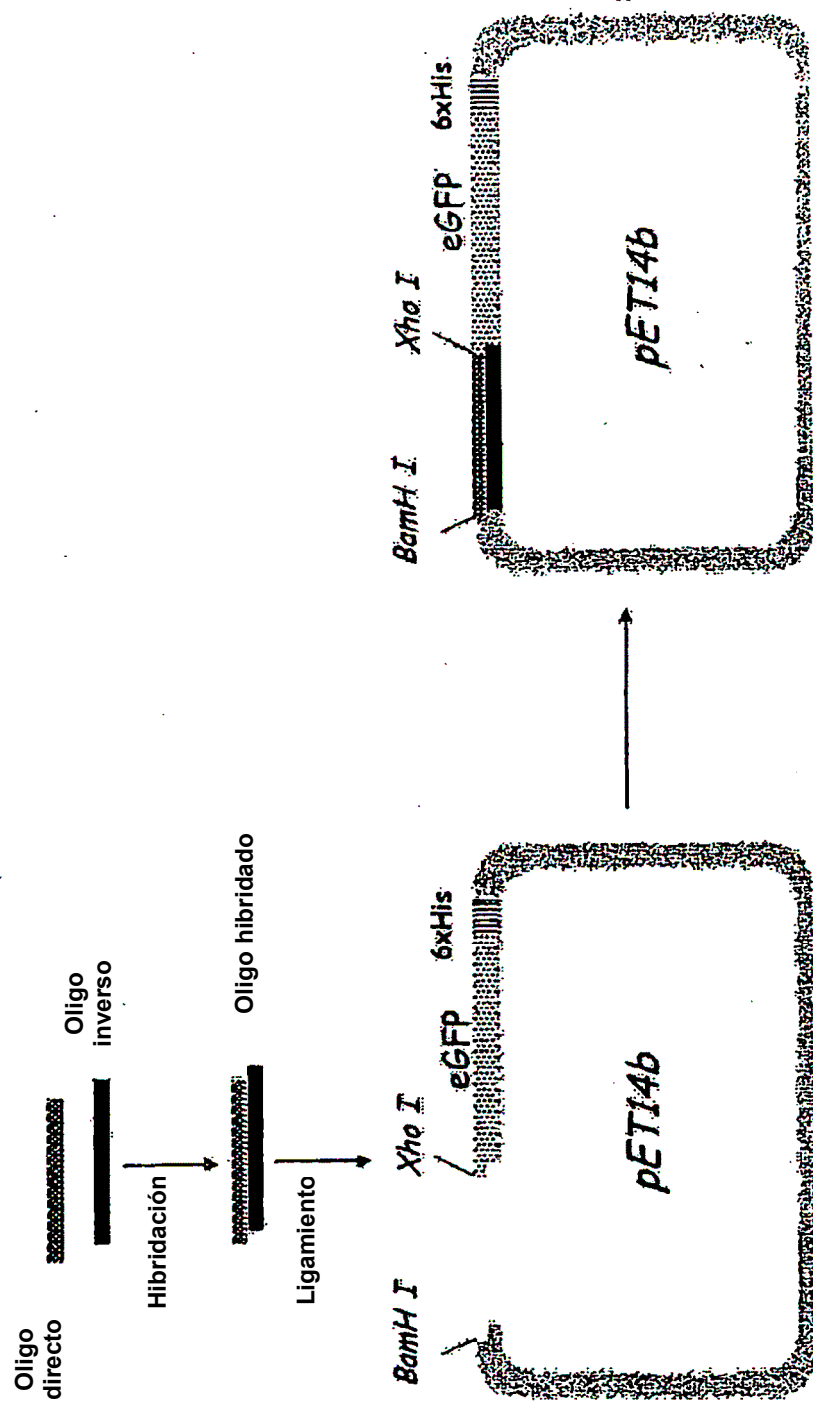


FIG. 17

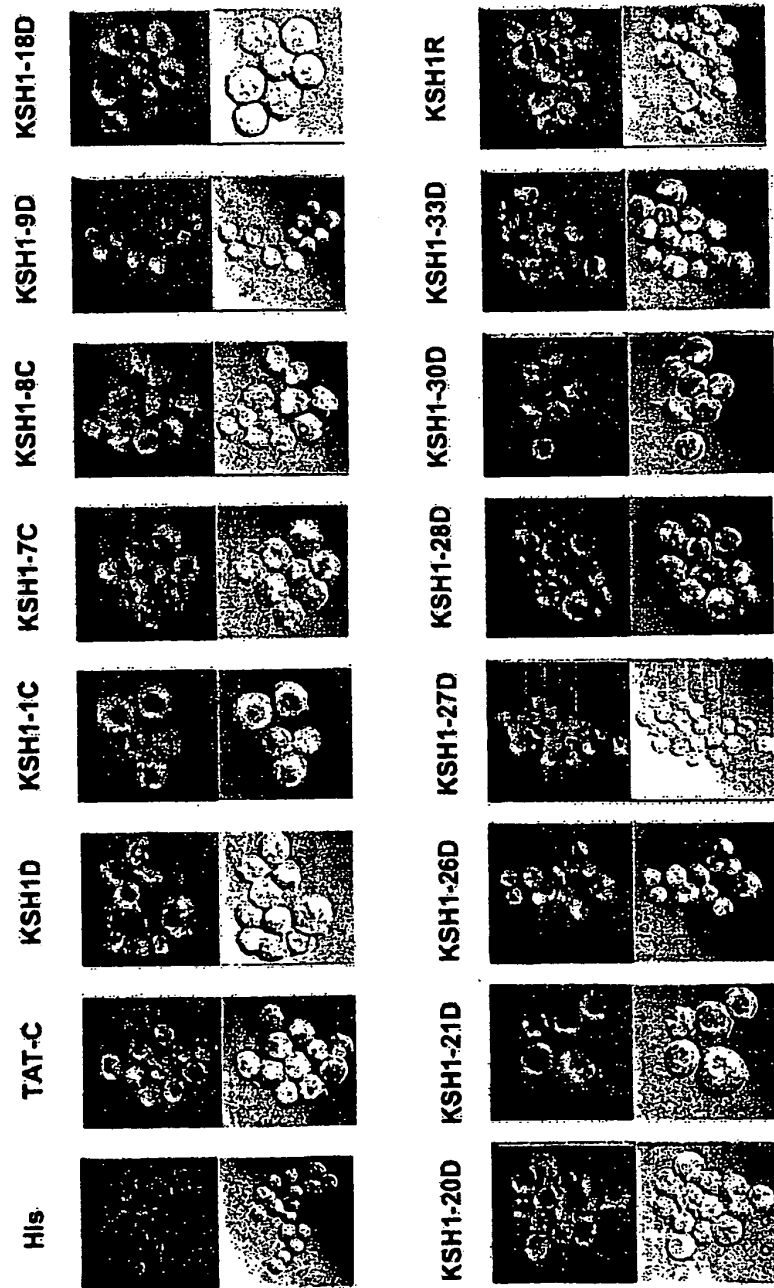


FIG. 18

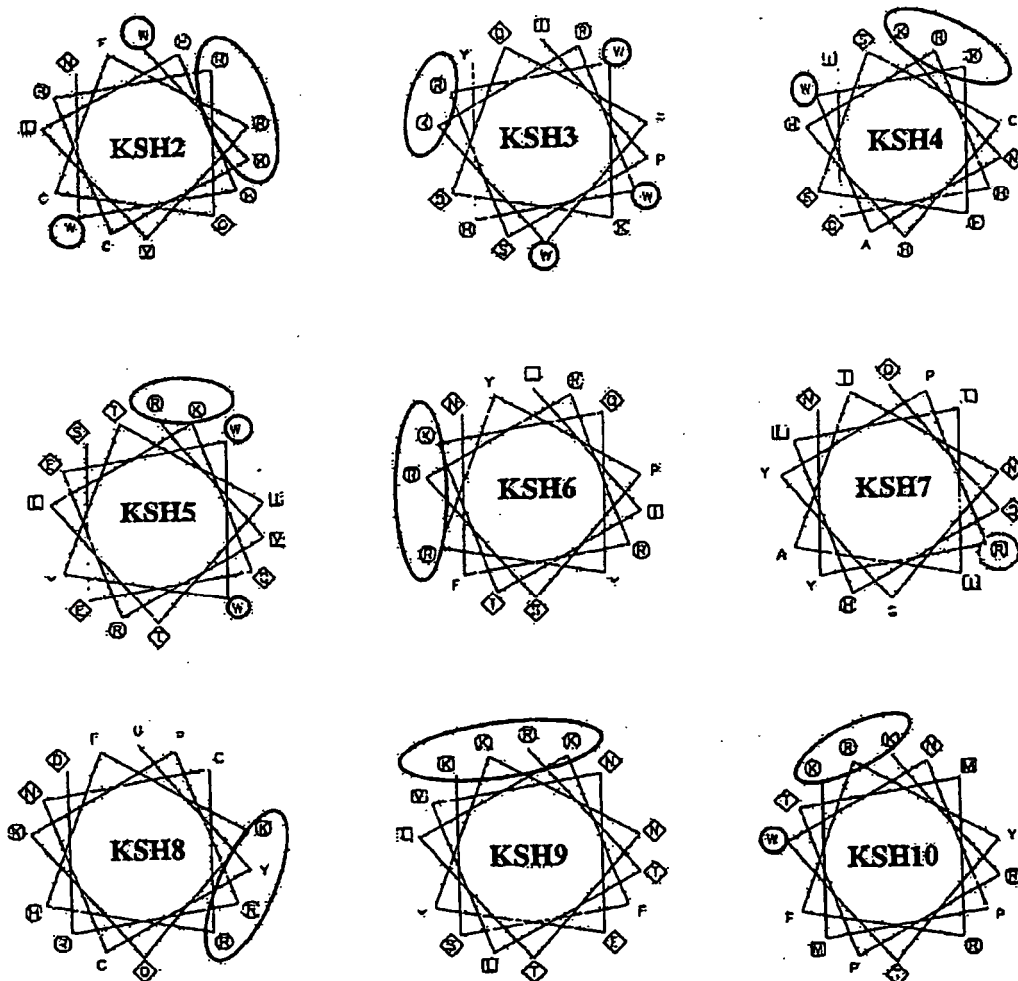


FIG. 19

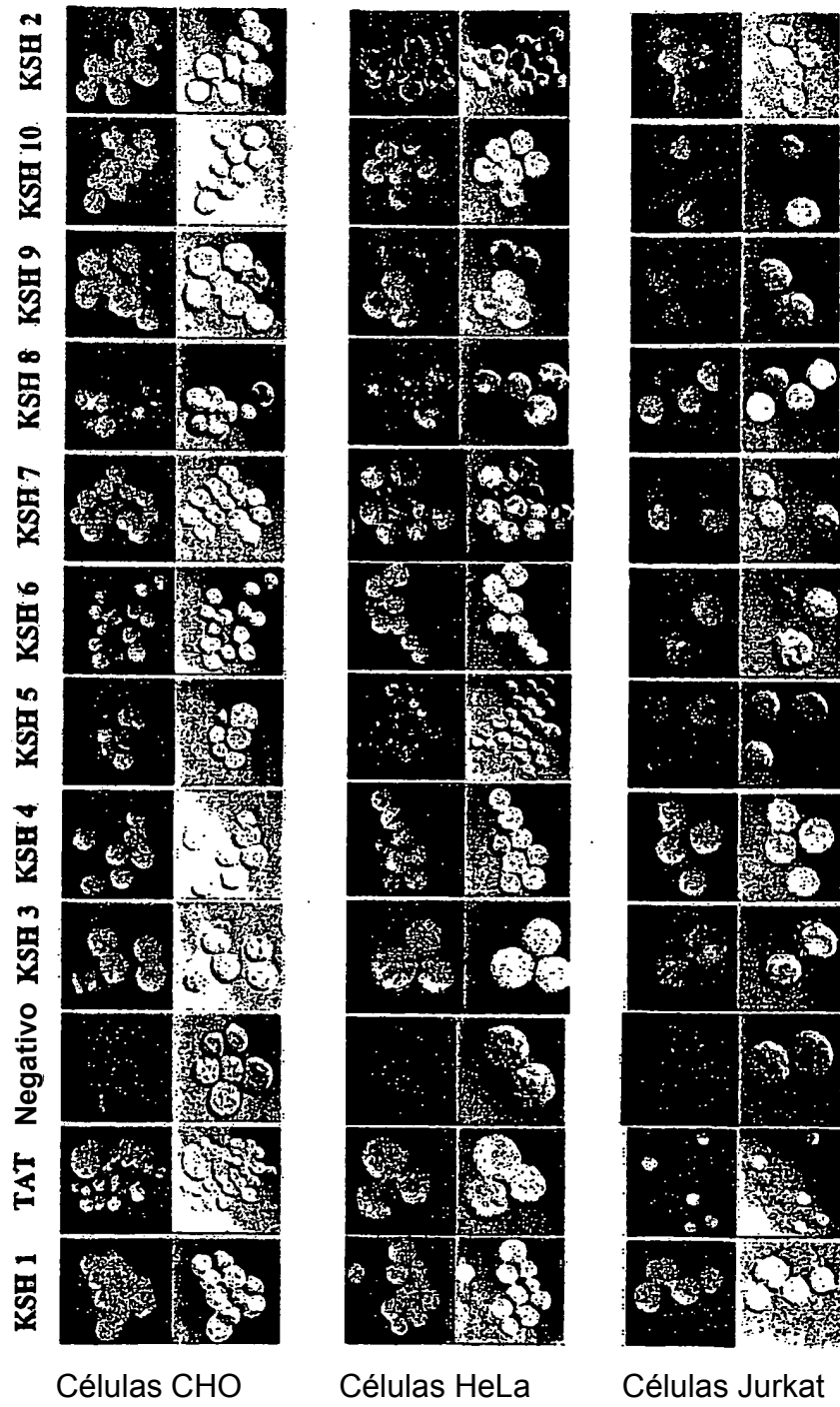


FIG. 20

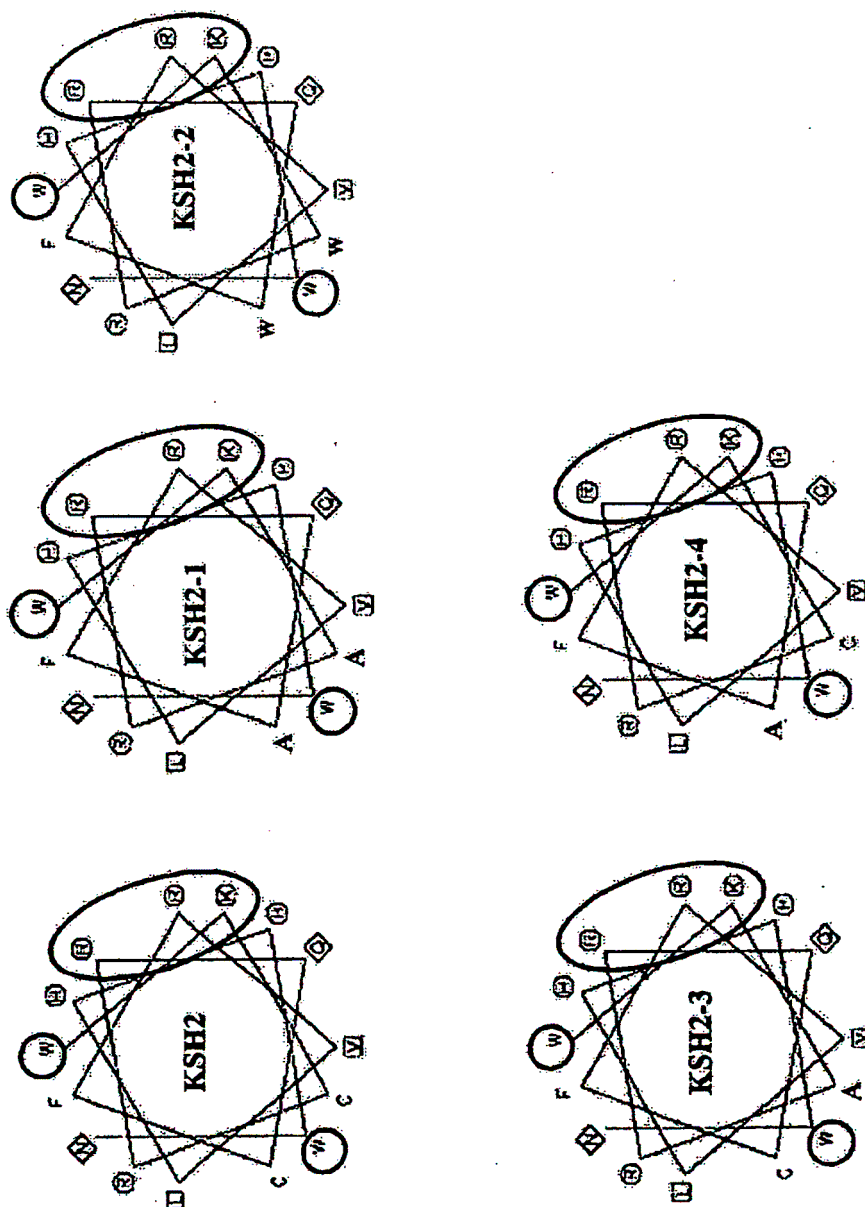


FIG. 21