

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 206**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07003426 .9**
96 Fecha de presentación: **12.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1811033**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Inhibidores peptídicos con permeabilidad celular de la ruta de transducción de la señal JNK**

30 Prioridad:
12.10.1999 US 158774 P
14.02.2000 US 503954

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
Xigen S.A.
Route de la Corniche 4
1066 Epalinges, CH

72 Inventor/es:
Bonny, Christophe

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbieto, Pablo

ES 2 381 206 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores peptídicos con permeabilidad celular de la ruta de transducción de la señal JNK.

5 En general, la presente invención se refiere a un péptido TAT retro-inverso D de secuencia SEQ ID nº 10, en particular de secuencia SEQ ID nº 8. Además, la invención se refiere al uso de dichos péptidos retro-inversos D como secuencias de tráfico.

10 En la técnica son conocidas secuencias de tráfico peptídicas basadas en TAT. En el documento WO 94/04686, Barsoum y col. describen el suministro de moléculas de carga biológicamente activas, tales como polipéptidos y ácidos nucleicos, al citoplasma y a los núcleos de células *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de polipéptidos de transporte que comprenden una o más partes de proteína TAT de VIH y que están unidos de forma covalente a moléculas de carga. Dichos polipéptidos de transporte están caracterizados por la presencia de la región básica tat (aminoácidos 49-57), la ausencia de la región TAT rica en cisteína (aminoácidos 22-36) y la ausencia del dominio carboxi terminal tat codificado de exón 2 (aminoácidos 73-86) de la proteína TAT natural.

15 Asimismo, la técnica anterior describe la síntesis de polipéptidos todo-D. Besalle y col. (FEBS Lett. 12 de noviembre de 1990; 274(1-2); 151-5) sintetizaron una magainina-2 todo-D para corroborar experimentalmente la idea de que la función biológica de un péptido tensioactivo se deriva principalmente de su estructura alfa helicoidal anfifílica única. De hecho, el péptido mostró una potencia antibacteriana casi idéntica a la del enantiómero todo-L. Al ser altamente resistente a la proteólisis y no hemolítica, se consideró que la magainina todo-D tenía una importancia terapéutica considerable.

20 El presente inventor ha descubierto ahora inesperadamente que los péptidos D-TAT y D-TAT-IB1 penetran en las células tan eficazmente como los péptidos L-TAT y L-TAT-IB1 y que los péptidos D-TAT y D-TAT-IB1 son más estables que los L-péptidos correspondientes.

La función de los péptidos según la presente invención se ilustra en el contexto de su uso como secuencia de tráfico con péptidos inhibidores de JNK.

Los péptidos, denominados aquí inhibidores peptídicos de JNK, disminuyen los efectos proliferativos en las células aguas abajo de la quinasa c-Jun amino terminal (JNK).

25 En consecuencia, la invención incluye péptidos quiméricos que incluyen un inhibidor peptídico de JNK enlazado a un péptido de tráfico que puede utilizarse para dirigir un péptido en el cual está presente hacia un lugar celular deseado.

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

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

35 Breve descripción de las figuras

Fig. 1A-C: diagramas mostrando las alineaciones de las regiones de dominio JBD conservadas en los factores de transcripción indicados.

Fig. 2: diagrama mostrando las alineaciones de péptidos de fusión TAT-IB genéricos.

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

Fig. 4: ilustración que demuestra los efectos de los péptidos TAT, TAT-IB1 y TAT-IB2 en la fosforilación de JNK recombinantes. El panel A muestra la inhibición de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 por los JNK recombinantes *in vitro*. El panel B muestra experimentos dosis-respuesta similares a los del Panel A.

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

- Fig. 6: ilustración que demuestra la inhibición de la fosforilación de c-Jun por JNK activados.
- Fig. 7: histograma que describe la inhibición a corto plazo de la muerte de células- β pancreáticas inducida por IL-1 β por los péptidos L-TAT-IB.
- 5 Fig. 8: histograma que describe la inhibición a corto plazo de la muerte de células- β pancreáticas inducida por IL-1 β por los péptidos D-TAT-IB.
- Fig. 9: histograma que describe la inhibición a largo plazo de la muerte de células- β pancreáticas inducida por IL-1 β por los péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1.
- Fig. 10: histograma que describe la inhibición de la muerte de células WiDr de cáncer de colon humano inducido por irradiación por los péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1.
- 10 Fig. 11: ilustración de la modulación de la actividad de la quinasa JNK por los péptidos L-TAT, TAT-IB1 y D-TAT-IB1.
- Fig. 12: gráficos que describen los efectos protectores de los péptidos TAT-IB1 en ratones. El panel A muestra el efecto de la radiación sobre el peso. El panel B muestra el efecto de la radiación sobre estados de edema y eritema.

15 Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto inesperadamente que los péptidos TAT retro-inversos D según la reivindicación 1, por ejemplo los péptidos D-TAT y D-TAT-IB1, penetran en las células tan eficazmente como los péptidos L-TAT y L-TAT-IB1 y que los péptidos D-TAT y D-TAT-IB1 son más estables que los L-péptidos correspondientes.

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

25 Los péptidos inhibidores de JNK se identificaron mediante inspección de las alineaciones de secuencia entre los Dominios de Unión de kJNK en diversas proteínas de unión a insulina (IB). Los resultados de esta alineación se muestran en las Figs. 1A-1C. La Fig. 1A describe la región de mayor homología entre los JBDs de IB1, IB2, c-Jun y ATF2. El panel B describe la alineación de las secuencias de aminoácidos de JBDs de IB1 e IB2. Los residuos totalmente conservados se indican con asteriscos, mientras que los residuos cambiados a Ala en el vector GFP-JBD_{23Mut} se indican con círculos. La Fig. 1C muestra las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas que incluyen un dominio de los péptidos inhibidores de JNK y un dominio de tráfico según la presente invención. El dominio de tráfico procede del polipéptido TAT del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el péptido inhibidor de JNK procede de un polipéptido IB1. Las secuencias humana, de ratón y de rata son idénticas en los Paneles B y C.

30

La comparación de las secuencias entre los dominios de unión de JNK de IB1 [SEQ ID n° 17], IB2 [SEQ ID n° 18], c-Jun [SEQ ID n° 19] y ATF2 [SEQ ID n° 20] reveló una secuencia de 8 aminoácidos parcialmente conservados (Fig. 1A). Una comparación de los JBDs de IB1 e IB2 reveló además dos bloques de siete y tres aminoácidos altamente conservados entre las dos secuencias. Estos dos bloques están contenidos en una secuencia peptídica de 23 aminoácidos en IB1 [SEQ ID n° 1] y de 21 aminoácidos en IB2 [SEQ ID n° 2].

35

Los péptidos inhibidores de JNK se pueden utilizar en cualquier situación donde se desee inhibir la actividad de JNK. Esto puede incluir aplicaciones *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Debido a que las JNKs y todas sus isoformas participan en el desarrollo y establecimiento de estados patológicos o en rutas, se pueden utilizar los péptidos de JNK para impedir o inhibir la aparición de estos estados patológicos. Esto incluye la prevención y el tratamiento de enfermedades, así como la prevención y tratamiento de estados secundarios a las acciones terapéuticas. Por ejemplo, los péptidos se pueden utilizar para tratar o prevenir, por ejemplo, la diabetes, radiación ionizante, respuestas inmunes (incluyendo enfermedades autoinmunes), lesiones isquémicas/por reperfusión, hipertrofias cardíacas y cardiovasculares y algunos cánceres (por ejemplo, transformación *Bcr-AbI*).

40

Los péptidos se pueden utilizar también para inhibir la expresión de aquellos genes cuya expresión aumenta en presencia de un polipéptido activo de JNK. Estos genes y productos genéticos incluyen, por ejemplo, a las citoquinas pro-inflamatorias. Estas citoquinas se encuentran en todas las formas de enfermedad inflamatoria, autoinflamatoria, inmune y autoinmune, de enfermedad degenerativa, miopatía, cardiomiopatía y rechazo de injertos.

45

Los péptidos inhibidores de JNK descritos aquí se pueden utilizar también para tratar o prevenir efectos asociados al estrés por tensión celular, por ejemplo en estados patológicos inducidos por hipertensión arterial, incluyendo hipertrofia cardíaca y lesiones arterioscleróticas, y en las bifurcaciones de los vasos sanguíneos y similares; la radiación ionizante, tal como se usa en radioterapia y luz ultravioleta; radicales libres; agentes que dañan el ADN, incluyendo por

50

medicamentos quimioterapéuticos; transformación oncogénica; isquemia y reperfusión; hipoxia; así como hipotermia e hipertermia.

En la Tabla 1 se muestran los péptidos inhibidores de JNK aquí descritos. La tabla indica el nombre del péptido inhibidor de JNK, así como su número identificador de secuencia, longitud y secuencia de aminoácidos.

5

Tabla 1

Nombre del péptido	SEQ ID	AA	Secuencia
L-IB1	1	23	DTYRPKRPTT LNLFPQVPRS QDT
L-IB2	2	21	EEPHKHRPTT LRLTTLGAQD S
D-IB1	3	23	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTD
D-IB2	4	21	SDQAGLTTLR LTTPRHKHPE E
L-IB (genérico)	5	19	XRPTTLXLXX XXXXXQDS/TX
D-IB (genérico)	6	19	XS/TDQXXXXXXXX XLXLTPRX
L-TAT	7	10	GRKKRRQRRR
D-TAT	8	10	RRRQRRKCRG
L-genérico-TAT	9	17	XXXXRKKRRQ RRRXXXX
D-genérico-TAT	10	17	XXXXRRRQRR KKRXXXX
L-TAT-IB1	11	35	GRKKRRQRRR PPDTYRPKRP TTLNLFPQVP RSQDT
L-TAT-IB2	12	33	GRKKRRQRRR PPEPHKHRP TTLRLTTLGA QDS
L-TAT-IB (genérico)	13	42	XXXXXXXXRKK RRQRRXXXX XXXRPTTLX LXXXXXXXXQD S/TX
D-TAT-IB1	14	35	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YDPPRRRQR RKKRG
D-TAT-IB2	15	33	SDQAGLTTLR LTTPRHKHPE EPPRRRQRRK KRG
D-TAT-IB (genérico)	16	42	XT/SDQXXXXXXXX XLXLTPRXX XXXXXRRRQ RRKKRXXXXX XX
IB1-largo	17	29	PGTGCGDTYR PKRPTTLNLF PQVPRSQDT
IB2-largo	18	27	IPSPSVEEPH KHRPTTLRLT TLGAQDS
c-Jun	19	29	GAYGYSNPKI LKQSMTLNLA DPVGNLKP
ATF2	20	29	TNEDHLAVHK HKHEMTLKFV PARNDSVIV

Péptidos inhibidores de JNK

El término "péptido" no implica una longitud concreta. En algunas realizaciones, el péptido inhibidor de JNK es inferior a 280 aminoácidos de longitud, por ejemplo inferior o igual a 150, 100, 75, 50, 35 ó 25 aminoácidos de longitud. En varias realizaciones, el péptido inhibidor de unión de JNK incluye la secuencia de aminoácidos de una o más de las SEQ ID n°: 1-6. El péptido inhibidor de JNK se une a JNK o el péptido inhibe la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun, ATF2 o Elk1.

Ejemplos de péptidos inhibidores de JNK incluyen un péptido que comprende (en su totalidad o en parte) la secuencia NH₂-DTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT-COOH [SEQ ID n°: 1]. En otra realización, el péptido incluye la secuencia NH₂-EPPHKHRPTTLRLTTLGAQDS-COOH [SEQ ID n°: 2].

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

Un péptido retro-inverso D puede tener la secuencia $\text{NH}_2\text{-TDQSRPVQPFNLTPRKPRTD-COOH}$ [SEQ ID n°: 3] o el péptido retro-inverso D puede tener la secuencia $\text{NH}_2\text{-SDQAGLTLRLTPRHKHPEE-COOH}$ [SEQ ID n°: 4]. Se ha descubierto inesperadamente que los péptidos TAT-IB retro-inversos D tienen varias propiedades útiles. Por ejemplo, los péptidos D-TAT y D-TAT-IB penetran en las células tan eficazmente como los péptidos L-TAT y L-TAT-IB y los péptidos D-TAT y D-TAT-IB son más estables que los L-péptidos correspondientes. Además, aunque los D-TAT-IB1 son ~10-20 veces menos eficaces en la inhibición de JNK que los L-TAT-IB, son ~ 50 veces más estables *in vivo*. Finalmente, tal como se expone adicionalmente a continuación, los péptidos D-TAT-IB protegen las células irradiadas ionizantes y tratadas con interleucina-1 contra la apoptosis.

Un péptido inhibidor de JNK puede incluir la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RPTTLXLXXXXXXXXXQDS/T-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID n°: 5 y los residuos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID n°: 13, tal como se muestra en la Fig. 2]. Tal como se utiliza aquí, X_n puede ser de cero residuos de longitud o puede ser una extensión contigua de residuos de péptidos procedentes de las SEQ ID n°: 1-2, preferentemente una extensión de entre 1 y 7 aminoácidos de longitud, o puede ser de 10, 20, 30 o más aminoácidos de longitud. El único residuo representado por S/T puede ser Ser o Thr en la secuencia genérica. En otras realizaciones, el péptido IB genérico puede ser un péptido retro-inverso D que tiene la secuencia $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-S/TDQXXXXXXXXLXLTTPR-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID n°: 6, y los residuos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID n°: 16, tal como se muestra en la Fig. 2].

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

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

Péptidos quiméricos que un incluyen un Dominio Inhibidor de JNK y un Dominio de Tráfico

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido quimérico que incluye un primer y un segundo dominio. El primer dominio incluye una secuencia de tráfico, mientras que el segundo dominio incluye una secuencia inhibidora de JNK enlazada por un enlace covalente, por ejemplo un enlace peptídico, al primer dominio. Los dominios primero y segundo pueden aparecer en cualquier orden en el péptido, y el péptido puede incluir uno o más de cada dominio. El péptido de tráfico según la presente invención incluye secuencias procedentes de la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)1. Esta proteína se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.804.604 y 5.674.980. Además, se puede definir un péptido de TAT que incluye la región que media la entrada y captación en las células por técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Franked y col., *Proc. Natl. Acad Sci, USA* 86: 7397-7401 (1989)).

La secuencia TAT según la reivindicación 1 puede estar enlazada al extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia inhibidora de JNK. Se puede añadir una bisagra de dos residuos prolina entre la TAT y el péptido inhibidor de JNK para crear el péptido de fusión total. Por ejemplo, los péptidos de fusión retro-inversos D pueden ser el péptido D-TAT-IB1 [SEQ ID n°: 14], el péptido D-TAT-IB2 [SEQ ID n°: 15] o el péptido genérico D-TAT-IB [SEQ ID n°: 16]. El péptido TAT puede ser un péptido retro-inverso D que tiene la secuencia $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RRRQRRKKR-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID n°: 10]. En las SEQ

ID nº: 5-6, 9-10, 13 y 16, el número de residuos "X" no se limita al que se describe y puede variar tal como se ha descrito anteriormente.

5 La secuencia inhibidora de JNK y la secuencia de tráfico según la reivindicación 1 pueden enlazarse mediante acoplamiento químico de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Numerosos métodos conocidos de reticulación química no son específicos, es decir que no dirigen el punto de acoplamiento hacia ningún lugar particular del polipéptido de transporte o macromolécula de carga. En consecuencia, la utilización de agentes reticulantes no específicos puede atacar los lugares funcionales o bloquear estéricamente los lugares activos, transformando las proteínas conjugadas en biológicamente inactivas.

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

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

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

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

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

A menudo, los reactivos de reticulación son poco solubles en agua. Al reactivo de reticulación se puede añadir una parte hidrófila, tal como un grupo sulfonato, para mejorar su solubilidad en agua. El sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados en cuanto a su solubilidad en agua.

Numerosos reactivos de reticulación producen un conjugado que es esencialmente no segmentable bajo condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de reticulación contienen un enlace covalente, tal como disulfuro, que es segmentable en condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) ("DSP") y N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato ("SPDP") son reticulantes segmentables bien conocidos. La utilización de un
55

reactivo de reticulación segmentable permite que la parte de cargo se separe del polipéptido de transporte después de su suministro a la célula diana. El enlace directo a disulfuro puede ser también útil.

5 Numerosos reactivos de reticulación, incluidos los expuestos anteriormente, son comerciales. Los suministradores comerciales ponen a disposición las instrucciones detalladas para su uso. Una referencia general sobre la reticulación de proteínas y preparación de conjugados es: Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION Y CROSS-LINKING, CRC Press (1991).

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

Alternativamente, el péptido quimérico se puede producir como un péptido de fusión que incluye la secuencia de tráfico y la secuencia inhibidora de JNK.

15 Los péptidos inhibidores de JNK y de fusión de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las sustancias mencionadas anteriormente, excipientes, vehículos, tampones o estabilizantes farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo o de otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal o en parche.

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

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

30 Cuando se trata de administrar a un individuo un polipéptido, un péptido u otro compuesto farmacéuticamente útil, la administración se realiza preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis se pueda considerar como terapia) suficiente que beneficie al individuo. La cantidad real administrada, así como la velocidad y la duración de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., está bajo la responsabilidad de los médicos generalistas y demás médicos, y tiene en cuenta típicamente el trastorno a tratar, el estado del paciente particular, el lugar de suministro, el método de administración y demás factores conocidos de los médicos. Los ejemplos de técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

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

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

50 La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas aquí descritas. Efectivamente, diversas modificaciones de la invención, además de las que descritas, se evidenciarán a los especialistas en la técnica a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas. Estas modificaciones forman parte del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos específicos**Ejemplo 1: Identificación de los Péptidos Inhibidores de JNK**

Se identificaron las secuencias de aminoácidos importantes para la interacción eficaz con JNK mediante las alineaciones de las secuencias entre los JBDs conocidos. La comparación de la secuencia entre los JBDs de IB1 [SEQ ID n°: 17], IB2 [SEQ ID n°: 18], c-Jun [SEQ ID n°: 19] y ATF2 [SEQ ID n°: 20] definió una secuencia de 8 aminoácidos débilmente conservada (Fig. 1A). Debido a que los JBDs de IB1 e IB2 son aproximadamente 100 veces más eficaces que c-Jun o ATF2 en la unión a JNK (Dickens y col., Science 277: 693 (1997)), se razonó que los residuos conservados entre IB1 e IB2 deberían ser importantes para conferir la máxima unión. La comparación entre los JBDs de IB1 e IB2 definió dos bloques de siete y tres aminoácidos que están muy conservados entre las dos secuencias. Estos dos bloques están incluidos en una secuencia peptídica de 23 aminoácidos en IB1 [SEQ ID n°: 1] y de 21 aminoácidos en IB2 [SEQ ID n°: 2]. Estas secuencias se muestran en la Fig. 1B, las rayas en la secuencia IB2 indican un espacio en la secuencia con el fin de alinear los residuos conservados.

Ejemplo 2: Preparación de las Proteínas de Fusión Inhibidoras de JNK

Se sintetizaron las proteínas de fusión inhibidoras de JNK enlazando de forma covalente el extremo C-terminal de JBD₂₃ o la secuencia de 21 aminoácidos procedente del JBD de IB2 (JBD₂₁) a un péptido transportador de 10 aminoácidos de tamaño N-terminal procedente de VIH-TAT₄₈₋₅₇ (Vives y col., J. Biol. Chem. 272: 16010 (1997)) a través de un espaciador compuesto de dos residuos de prolina. Este espaciador se utilizó para permitir la máxima flexibilidad e impedir cambios estructurales secundarios no deseados. Como se muestra en la FIG. 1C, estas preparaciones se designaron L-TAT [SEQ ID n°: 7], L-TAT-IB1 [SEQ ID n°: 11] y L-TAT-IB2 [SEQ ID n°: 12], respectivamente. Se sintetizaron también péptidos de fusión TAT de los péptidos retro-inversos todo-D y se designaron D-TAT [SEQ ID n°: 8] y D-TAT-IB1 [SEQ ID n°: 14], respectivamente. Todos los péptidos D y L se produjeron mediante síntesis F-simulada clásica y se analizaron después por espectrometría de masas. Se purificaron finalmente por HPLC. Para determinar los efectos del espaciador de prolina, se produjeron dos tipos de péptido TAT, uno con dos prolinas y uno sin ellas. No parece que la adición de las dos prolinas modifique la entrada o la localización del péptido TAT dentro de las células.

Los péptidos genéricos que muestran los residuos aminoácidos conservados se muestran en la FIG. 2. Una "X" indica cualquier aminoácido. El número de X en un péptido determinado no se limita al que se describe y puede variar. Véase arriba para una descripción más detallada de las secuencias genéricas.

Ejemplo 3: Inhibición de la Muerte de Células-β por JBD₂₃

Se estudiaron entonces los efectos de la secuencia de JBD de 23 aminoácidos de tamaño de IB1 sobre la actividad biológica de JNK. La secuencia de 23 aminoácidos estaba enlazada en el N-terminal a la Proteína Fluorescente Verde (constructo GFP-JBD₂₃) y se evaluó el efecto de este constructo sobre la apoptosis de células-β pancreáticas inducida por IL-1β. Véase la FIG. 3. Se había demostrado previamente que este modo de apoptosis se bloqueaba por la transfección con JBD₁₋₂₈₀, mientras que los inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 no protegían. Véase Ammendrup y col, más arriba.

Los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de 23 aminoácidos (JBD₂₃; Fig. 1B) y una secuencia mutada en las regiones totalmente conservadas (JBD_{23mut}) fueron sintetizados e insertados direccionalmente en los sitios EcoRI y Sall del vector pEGFP-N1 que codifica la Proteína Fluorescente Verde (GFP) (de Clontech). Se cultivaron célulasβTC -3 productoras de insulina en medio RPMI 1640 complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 µg/ml de estreptomina, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM glutamina. Las célulasβTC -3 productoras de insulina fueron transfectadas con los vectores indicados y se añadió IL-1β (10 ng/ml) al medio de cultivo celular. El número de células apoptóticas se contó 48 horas después de la adición de IL-1β utilizando un microscopio de fluorescencia invertido. Se distinguieron las células apoptóticas de las células normales por la "formación de ampollas" característica del citoplasma y se contaron después de dos días.

Tal como se indica en la Fig. 3, GFP es el vector de expresión de la Proteína Fluorescente Verde utilizado como control; JBD₂₃ es el vector que expresa una GFP quimérica enlazada a la secuencia de 23 aminoácidos procedente del JBD de IB1; JBD_{23Mut} es el mismo vector que GFP-JBD₂₃, pero con un JBD mutado en cuatro residuos conservados mostrados en la FIG 1B; y JBD₂₈₀ es el vector de GFP enlazado al JBD completo (aminoácidos 1-280). El constructo de expresión GFP-JBD₂₃ impidió la apoptosis de célulasβ pancreáticas inducida por IL -1β tan eficazmente como el JBD₁₋₂₈₀ completo (Fig. 3, JBD₂₃/IL-1 comparado con JBD₂₈₀/IL-1). Como controles adicionales, las secuencias mutadas en los residuos de IB1 totalmente conservados tenían una capacidad muy reducida de impedir la apoptosis (Fig. 3, JBD_{23Mut}/IL-1).

Ejemplo 4: Importación Celular de los Péptidos TAT-IB1 y TAT-IB2

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

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

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

Ejemplo 5: Inhibición *In Vitro* de la Fosforilación de c-JUN, ATF2 y Elk1

20 Se investigaron *in vitro* los efectos de los péptidos sobre la fosforilación mediada por los JNKs de sus factores de transcripción diana. Se produjeron JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes y no activados con un kit de lisados de reticulocitos de conejo de TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN (Promega) y se utilizaron en ensayos de quinasa en fase sólida con c-Jun, ATF2 y Elk1, solos o fusionados con glutatión-S-transferasa (GST), como sustratos. Se realizaron estudios dosis-respuesta en los que los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2 (0-25 μ M) se mezclaron con las quinazas JNK1, JNK2 o JNK3 recombinantes en un tampón de reacción (20 mM Tris-acetato, 1 mM EGTA, 10 mM p-nitrofenilfosfato (pNPP), 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM p-glicerofosfato, 1 mM ditioneitol) durante 20 minutos. Las reacciones de las quinazas se iniciaron entonces mediante la adición de 10 mM $MgCl_2$ y 5 μ Ci de ^{33}P - γ -dATP y 1 μ g de GST-Jun (aminoácidos 1-89), GST-AFT2 (aminoácidos 1-96) o GST-ELK1 (aminoácidos 307-428). Las proteínas de fusión con GST se compraron a Stratagene (La Jolla, CA). Se añadieron también a la mezcla un tampón de perlas de glutatión-agarosa. Los productos de reacción se separaron entonces por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturizante. Se secaron los geles y se expusieron posteriormente a películas de rayos X (Kodak). Se observó una inhibición casi completa de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 por JNKs a dosis de péptidos TAT-IB tan bajas como de 2,5 μ M. Sin embargo, la excepción notable fue la ausencia de inhibición por TAT-IB de la fosforilación de JNK3 de Elk1. En general, el péptido TAT-IB1 apareció ligeramente superior a TAT-IB2 en la inhibición de la fosforilación de la familia JNK de sus factores de transcripción diana (véase la FIG. 4A).

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

Ejemplo 6: Inhibición de la Fosforilación de c-JUN por JNK Activadas

40 Se evaluaron los efectos de los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ó L-TAT-IB2 sobre las JNK activadas por estímulos estresantes utilizando GST-Jun para reducir las JNK procedentes de células HeLa irradiadas con luz UV o células β TC tratadas con IL-1 β . Se cultivaron células β TC tal como se ha descrito anteriormente. Se cultivaron las células HeLa en un medio DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 μ g/ml de estreptomomicina, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM de glutamina. Una hora antes de utilizarlas para la preparación del extracto celular, se activaron células β TC con IL-1 β tal como se ha descrito anteriormente, mientras que las células HeLa fueron activadas por luz UV (20 J/m²). Se prepararon extractos celulares a partir de células control, células HeLa irradiadas con luz UV y células β TC-3 tratadas con IL-1 β , raspando los cultivos celulares en un tampón de lisis (20 mM Tris-acetato, 1mM EGTA, Triton-X-100 al 1%, 10 mM p-nitrofenilfosfato, 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM β -glicerofosfato, 1 mM ditioneitol). Se eliminaron los residuos por centrifugación durante cinco minutos a 15.000 rpm en un rotor SS-34 Beckman. Se incubaron cien μ g de extractos durante una hora a temperatura ambiente con un μ g de GST-Jun (aminoácidos 1-89) y 10 μ l de perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Después de cuatro lavados con el tampón de raspado, se resuspendieron las perlas en el mismo tampón complementado con los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2 (25 μ M) durante 20 minutos. Las reacciones de las quinazas se iniciaron entonces mediante la adición de 10 mM de $MgCl$ y 5 μ Ci de ^{33}P - γ -dATP y se incubaron durante 30 minutos a 30°C. Los productos de reacción se separaron entonces por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturizante. Se secaron los geles y se expusieron posteriormente a películas de rayos X (Kodak). En estos experimentos, los péptidos TAT-IB impidieron eficazmente la fosforilación de c-Jun por las JNK activadas (véase la Fig. 6).

Ejemplo 7: Inhibición *In Vivo* de la Fosforilación de c-JUN por los Péptidos TAT-IB

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

Ejemplo 8: Inhibición de la Muerte de Células-β Pancreáticas Inducida por IL-1β mediante Péptidos TAT-IB

Investigamos los efectos de los péptidos L-TAT-IB sobre la promoción de la apoptosis de células-β pancreáticas provocada por IL-1β. Se incubaron cultivos celulares de βTC-3 durante 30 minutos con 1 µM de los péptidos L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2, seguido de 10 ng/ml de IL-1β. Se realizó una segunda adición del péptido (1 µM) 24 horas más tarde. Se contaron las células apoptóticas después de dos días de incubación con IL-1β utilizando una tinción nuclear con yoduro de propidio (las células de color rojo son células muertas) y Hoechst 33342 (las células de color azul son células con la membrana plasmática intacta). Como se muestra en la Fig. 5, la adición de los péptidos TAT-IB inhibió la apoptosis inducida por IL-1β de las células βTC-3 cultivadas dos días en presencia de IL-1β.

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

Ejemplo 9: Síntesis de Péptido Retro-Inversos Todo-D

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

Los péptidos retro-inversos de la invención son análogos sintetizados utilizando aminoácidos D mediante la unión de los aminoácidos en una cadena peptídica de modo tal que la secuencia de aminoácidos en el análogo de péptido retro-inverso sea exactamente contraria a la secuencia en el péptido seleccionado que sirve de modelo. Para ilustrarlo, si la proteína TAT natural (formada por aminoácidos L) tiene la secuencia GRKKRRQRRR [SEQ ID n°: 7], el análogo de péptido retro-inverso de este péptido (formado por aminoácidos D) tendrá la secuencia RRRQRRKKRG [SEQ ID n°: 8]. Son conocidos en la técnica los procedimientos para sintetizar una cadena de aminoácidos D para formar péptidos retro-inversos. Véase por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693 (1994); Guichard y col., J. Med. Chem. 39, 2030-2039 (1996). De forma específica, los retro-péptidos se produjeron por medio de síntesis F-simulada clásica y se analizaron después por espectrometría de masas. Se purificaron finalmente por HPLC.

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

Ejemplo 10: Actividad Biológica a Largo Plazo de los Péptidos IB Retro-Inversos todo-D

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

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

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

Ejemplo 11: Inhibición de la Muerte de Células- β Pancreáticas Inducida por Irradiación por los Péptidos TAT-IB

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

Ejemplo 12: Radioprotección contra la Radiación Ionizante por los Péptidos TAT-IB

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

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

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

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

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

Ejemplo 13: Supresión de los Factores de Transcripción de JNK por los Péptidos L-TAT-IB1

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

A partir de la descripción detallada anterior de las realizaciones específicas de la invención es evidente que se han descrito péptidos bioactivos con permeabilidad celular únicos. Aunque se hayan revelado aquí en detalle realizaciones particulares, esto se ha hecho a modo de ejemplo con un propósito solamente ilustrativo y no se pretende que sean limitativas con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas siguientes.

5

REIVINDICACIONES

1. Péptido TAT retro-inverso D de secuencia SEQ ID n°: 10.
2. Péptido TAT retro-inverso D según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido tiene la secuencia SEQ ID n°: 8.
- 5 3. Uso *in vitro* del péptido retro-inverso D según la reivindicación 1 ó 2 como secuencia de tráfico.
4. Péptido retro-inverso D según la reivindicación 1 ó 2 para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, caracterizado porque se utiliza como secuencia de tráfico el péptido retro-inverso D según la reivindicación 1 ó 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Xigen S.A.

<120> Inhibidores peptídicos con permeabilidad celular de la ruta de transducción de señales de JNK

<130> U001P003WOEPT1

5 <140>

<141>

<150> US 60/158.774 y 09/503954

<151> 1999-10-12 y 2000-02-14

<160> 21

10 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Desconocido

15

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido inhibidor de JNK L-IB1

<400> 1

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

Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
20

20 <210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Desconocido

25 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido inhibidor de JNK L-IB2

<400> 2

Glu Glu Pro His Lys His Arg Pro Thr Thr Leu Arg Leu Thr Thr Leu
1 5 10 15

Gly Ala Gln Asp Ser
20

<210> 3

ES 2 381 206 T3

<211> 23

<212> PRT

<213> Desconocido

5 <220>

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

<400> 3

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

10 Arg Lys Pro Arg Tyr Thr Asp
20

<210> 4

<211> 21

15 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

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

20

<400> 4

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

Lys His Pro Glu Glu
20

25 <210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Desconocido

30 <220>

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

<220>
 <221> VARIACIÓN
 <222> (1)..(1)
 5 <223> /reemplazar="Arg"
 /reemplazar="Asx"
 /reemplazar="Cys"
 /reemplazar="Glx"
 /reemplazar="Gly"
 10 /reemplazar="His"
 /reemplazar="Ile"
 /reemplazar="Leu"
 /reemplazar="Lys"
 /reemplazar="Met"
 15 /reemplazar="Phe"
 /reemplazar="Pro"
 /reemplazar="Ser"
 /reemplazar="Thr"
 /reemplazar="Trp"
 20 /reemplazar="Tyr"
 /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Xaa"
 /reemplazar=" "

 25 <220>
 <221> VARIACIÓN
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar="Arg"
 /reemplazar="Asx"
 30 /reemplazar="Cys"
 /reemplazar="Glx"
 /reemplazar="Gly"
 /reemplazar="His"
 /reemplazar="Ile"
 35 /reemplazar="Leu"
 /reemplazar="Lys"
 /reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"
/reemplazar="Pro"
/reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
5 /reemplazar="Trp"
/reemplazar="Tyr"
/reemplazar="Val"
/reemplazar="Xaa"
/reemplazar=""
10
<220>
<221> VARIACIÓN
<222> (9)..(15)
<223> /reemplazar="Arg"
15 /reemplazar="Asx"
/reemplazar="Cys"
/reemplazar="Glx"
/reemplazar="Gly"
/reemplazar="His"
20 /reemplazar="Ile"
/reemplazar="Leu"
/reemplazar="Lys"
/reemplazar="Met"
/reemplazar="Phe"
25 /reemplazar="Pro"
/reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
/reemplazar="Trp"
/reemplazar="Tyr"
30 /reemplazar="Val"
/reemplazar="Xaa"
/reemplazar=" "

<220>
35 <221> VARIACIÓN
<222> (18)..(18)
<223> /reemplazar="Thr"

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (19)..(19)

5 <223> /reemplazar="Arg"

/reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

/reemplazar="Gly"

10 /reemplazar="His"

/reemplazar="Ile"

/reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

/reemplazar="Met"

15 /reemplazar="Phe"

/reemplazar="Pro"

/reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

/reemplazar="Trp"

20 /reemplazar="Tyr"

/reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

25 <400> 5

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

Asp Ser Ala

<210> 6

30 <211> 19

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido inhibidor de JNK D-IB (genérico) (XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX)

<220>

<221> VARIACIÓN

5 <222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Arg"

/reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

10 /reemplazar="Gly"

/reemplazar="His"

/reemplazar="Ile"

/reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

15 /reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"

/reemplazar="Pro"

/reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

20 /reemplazar="Trp"

/reemplazar="Tyr"

/reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

25

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Thr"

30

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (5)..(11)

<223> /reemplazar="Arg"

35 /reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

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

<220>
<221> VARIACIÓN
<222> (13)..(13)
20 <223> /reemplazar="Arg"
/reemplazar="Asx"
/reemplazar="Cys"
/reemplazar="Glx"
/reemplazar="Gly"
25 /reemplazar="His"
/reemplazar="Ile"
/reemplazar="Leu"
/reemplazar="Lys"
/reemplazar="Met"
30 /reemplazar="Phe"
/reemplazar="Pro"
/reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
/reemplazar="Trp"
35 /reemplazar="Tyr"
/reemplazar="Val"
/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

<220>

<221> VARIACIÓN

5 <222> (19)..(19)

<223> /reemplazar="Arg"

/reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

10 /reemplazar="Gly"

/reemplazar="His"

/reemplazar="Ile"

/reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

15 /reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"

/reemplazar="Pro"

/reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

20 /reemplazar="Trp"

/reemplazar="Tyr"

/reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

25

<400> 6

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

Pro Arg Ala

<210> 7

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

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

<220>
<221> VARIACIÓN
15 <222> (14)..(17)
<223> /reemplazar="Arg"
/reemplazar="Asx"
/reemplazar="Cys"
/reemplazar="Glx"
20 /reemplazar="Gly"
/reemplazar="His"
/reemplazar="Ile"
/reemplazar="Leu"
/reemplazar="Lys"
25 /reemplazar="Met"
/reemplazar="Phe"
/reemplazar="Pro"
/reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
30 /reemplazar="Trp"
/reemplazar="Tyr"
/reemplazar="Val"
/reemplazar="Xaa"
/reemplazar=" "
35
<400> 9

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

Ala

<210> 10

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

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

10

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (1)..(4)

<223> /reemplazar="Arg"

15 /reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

/reemplazar="Gly"

/reemplazar="His"

20 /reemplazar="Ile"

/reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

/reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"

25 /reemplazar="Pro"

/reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

/reemplazar="Trp"

/reemplazar="Tyr"

30 /reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (19)..(17)

<223> /reemplazar="Arg"

/reemplazar="Asx"

5 /reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

/reemplazar="Gly"

/reemplazar="His"

/reemplazar="Ile"

10 /reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

/reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"

/reemplazar="Pro"

15 /reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

/reemplazar="Trp"

/reemplazar="Tyr"

/reemplazar="Val"

20 /reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

<400> 10

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

25 Ala

<210> 11

<211> 35

<212> PRT

30 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de secuencia: proteína de fusión inhibidora de JNK L-TAT-IB1

ES 2 381 206 T3

<400> 11

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

Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser
20 25 30

Gln Asp Thr
35

<210> 12

<211> 33

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de secuencia: proteína de fusión inhibidora de JNK L-TAT-IB2

10

<400> 12

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Glu Glu Pro His
1 5 10 15

Lys His Arg Pro Thr Thr Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp
20 25 30

Ser

15 <210> 13

<211> 42

<212> PRT

<213> Desconocido

20 <220>

<223> Descripción de secuencia: proteína de fusión inhibidora de JNK L-TAT-IB (genérica)
(XXXXXXXXRKKRRRQRRRXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQ-DS/TX)

<220>

25 <221> VARIACIÓN

<222> (1)..(7)

<223> /reemplazar="Arg"

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

20 <220>
<221> VARIACIÓN
<222> (17)..(24)
<223> /reemplazar="Arg"
/reemplazar="Asx"
25 /reemplazar="Cys"
/reemplazar="Glx"
/reemplazar="Gly"
/reemplazar="His"
/reemplazar="Ile"
30 /reemplazar="Leu"
/reemplazar="Lys"
/reemplazar="Met"
/reemplazar="Phe"
/reemplazar="Pro"
35 /reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
/reemplazar="Trp"

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

 <220>
 30 <221> VARIACIÓN
 <222> (32)..(38)
 <223> /reemplazar="Arg"
 /reemplazar="Asx"
 /reemplazar="Cys"
 35 /reemplazar="Glx"
 /reemplazar="Gly"
 /reemplazar="His"

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

 15 <220>
 <221> VARIACIÓN
 <222> (41)..(41)
 <223> /reemplazar="Thr"

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

/reemplazar="Tyr"

/reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

5

<400> 13

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

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

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

10 <210> 14

<211> 35

<212> PRT

<213> Desconocido

15 <220>

<223> Descripción de secuencia: proteína de fusión inhibidora de JNK D-TAT-IB1

<400> 14

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

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

Lys Arg Gly
35

20

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

25 <213> Desconocido

<220>

ES 2 381 206 T3

<223> Descripción de secuencia: proteína de fusión inhibidora de JNK D-TAT-IB2

<400> 15

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

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

5 Gly

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

10 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de secuencia: proteína de fusión inhibidora de JNK D-TAT-IB (genérica)
(XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX)

15

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Arg"

20 /reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

/reemplazar="Gly"

/reemplazar="His"

25 /reemplazar="Ile"

/reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

/reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"

30 /reemplazar="Pro"

/reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

/reemplazar="Trp"
/reemplazar="Tyr"
/reemplazar="Val"
/reemplazar="Xaa"
5 /reemplazar=" "
<220>
<221> VARIACIÓN
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Ser"
10
<220>
<221> VARIACIÓN
<222> (5)..(11)
<223> /reemplazar="Arg"
15 /reemplazar="Asx"
/reemplazar="Cys"
/reemplazar="Glx"
/reemplazar="Gly"
/reemplazar="His"
20 /reemplazar="Ile"
/reemplazar="Leu"
/reemplazar="Lys"
/reemplazar="Met"
/reemplazar="Phe"
25 /reemplazar="Pro"
/reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
/reemplazar="Trp"
/reemplazar="Tyr"
30 /reemplazar="Val"
/reemplazar="Xaa"
/reemplazar=" "

<220>
35 <221> VARIACIÓN
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="Arg"

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

20 <220>
<221> VARIACIÓN
<222> (19)..(26)
<223> /reemplazar="Arg"
/reemplazar="Asx"
25 /reemplazar="Cys"
/reemplazar="Glx"
/reemplazar="Gly"
/reemplazar="His"
/reemplazar="Ile"
30 /reemplazar="Leu"
/reemplazar="Lys"
/reemplazar="Met"
/reemplazar="Phe"
/reemplazar="Pro"
35 /reemplazar="Ser"
/reemplazar="Thr"
/reemplazar="Trp"

/reemplazar="Tyr"

/reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=""

5

<220>

<221> VARIACIÓN

<222> (36)..(42)

<223> /reemplazar="Arg"

10 /reemplazar="Asx"

/reemplazar="Cys"

/reemplazar="Glx"

/reemplazar="Gly"

/reemplazar="His"

15 /reemplazar="Ile"

/reemplazar="Leu"

/reemplazar="Lys"

/reemplazar="Met"

/reemplazar="Phe"

20 /reemplazar="Pro"

/reemplazar="Ser"

/reemplazar="Thr"

/reemplazar="Trp"

/reemplazar="Tyr"

25 /reemplazar="Val"

/reemplazar="Xaa"

/reemplazar=" "

<400> 16

30

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

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

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

ES 2 381 206 T3

<210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia: JBD de IB1, IB1-largo

<400> 17

10

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

<210> 18
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Desconocido

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia: JBD de IB2, IB2-largo

20

<400> 18

Ile Pro Ser Pro Ser Val Glu Glu Pro His Lys His Arg Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp Ser
 20 25

25

<210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia: JBD de c-Jun, c-Jun

ES 2 381 206 T3

<400> 19

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

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

5

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Desconocido

10

<220>

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

<400> 20

15

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

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

<210> 21

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de secuencia: sonda de doble marcado AP-1 (véase la página 22 de la descripción)

25

<400> 21

cgcttgatga gtcagccgga a 21

FIG. 1 - Secuencias Peptídicas, Humano, Ratón y Rata

:: **::

A

IB2 : IPSPSVEEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
 IB1 : PGTGGDTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT
 c-Jun : GAYGYSNPKILKQSMTLNLAADPVGNLKPH
 ATF2 : TNEDHLAVHKHKHEMTLKFQPARNDIV

B

: . . ***** * **:
 L-IB2 : EEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
 L-IB1 : DTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT
 o o o

C

L-TAT : NH₂- GRKKRRQRRR -COOH
 L-TAT-IB1 : NH₂- GRKKRRQRRRPPDYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT -COOH
 L-TAT-IB2 : NH₂- GRKKRRQRRRPEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS -COOH
 D-TAT : NH₂- RRRQRKKRG -COOH
 D-TAT-IB1' : NH₂- TDQSRPVQPFLLNLTTPRKPRTYDPPRRRQRKKRG -COOH

Fig. 2 - Secuencias Genéricas, Humano, Ratón y Rata

L-TAT-IB : NH₂- XXXXXXKRRRQRRRXXXXXXXXXXRPTLXXXXXXXXQDS/TX -COOH
D-TAT : NH₂- XXXRRRQRRKRRXXX -COOH
D-TAT-IB : NH₂- XT/SDXXXXXXXXLTLTPRXXXXXXXXRRRQRRKRRXXXXXXXX -COOH

FIG. 3

Efectos del Constructo GFP-JBD₂₃ sobre la Apoptosis de Células- β Pancreáticas

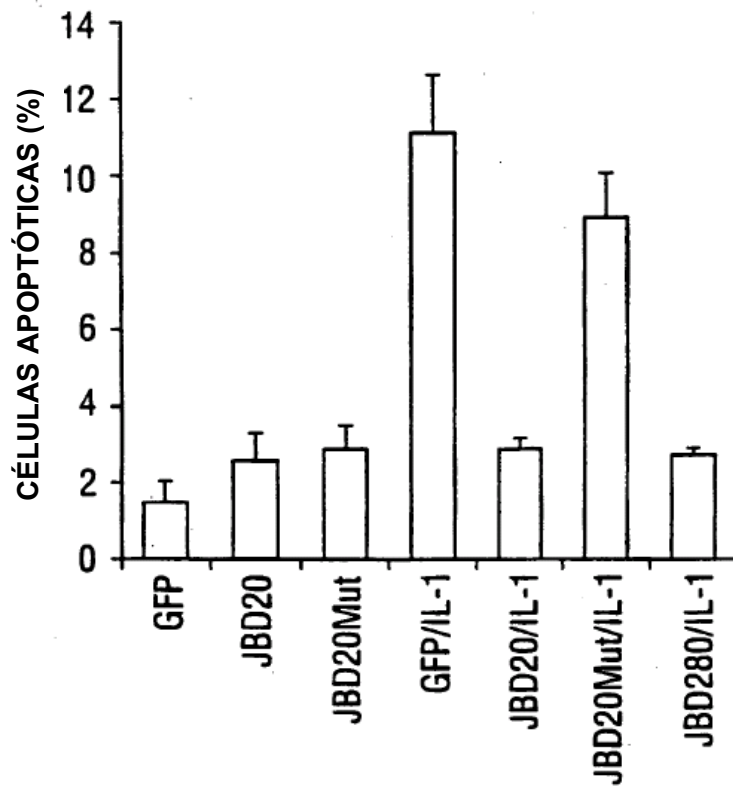


FIG. 4a

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

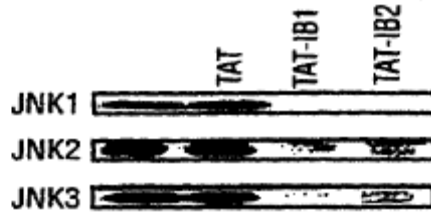


FIG. 4b

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

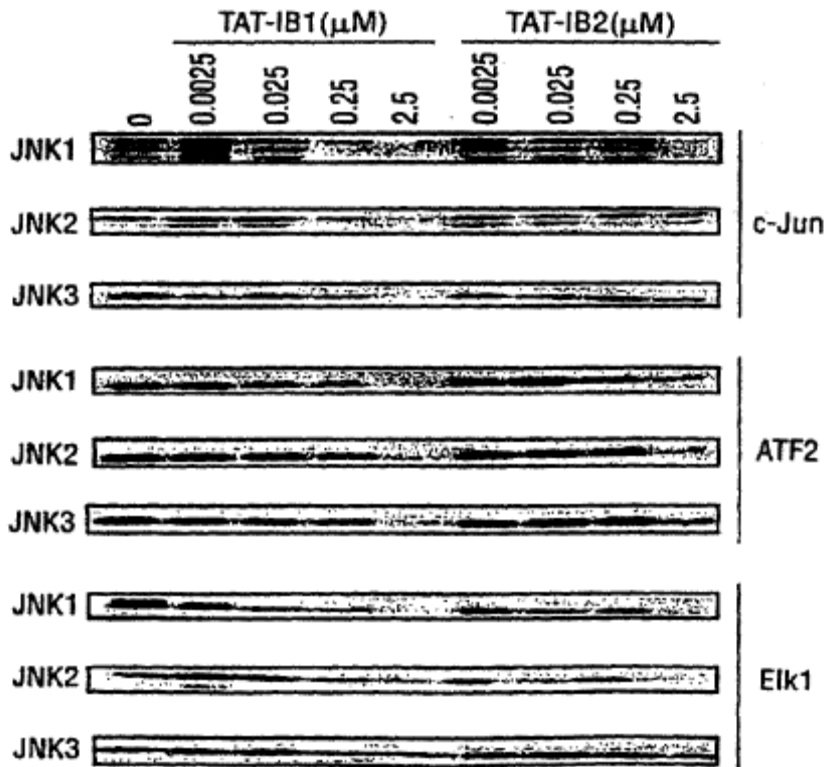


FIG. 5 - Inhibición de la Fosforilación de L-TAT-IB por JNKs Recombinantes

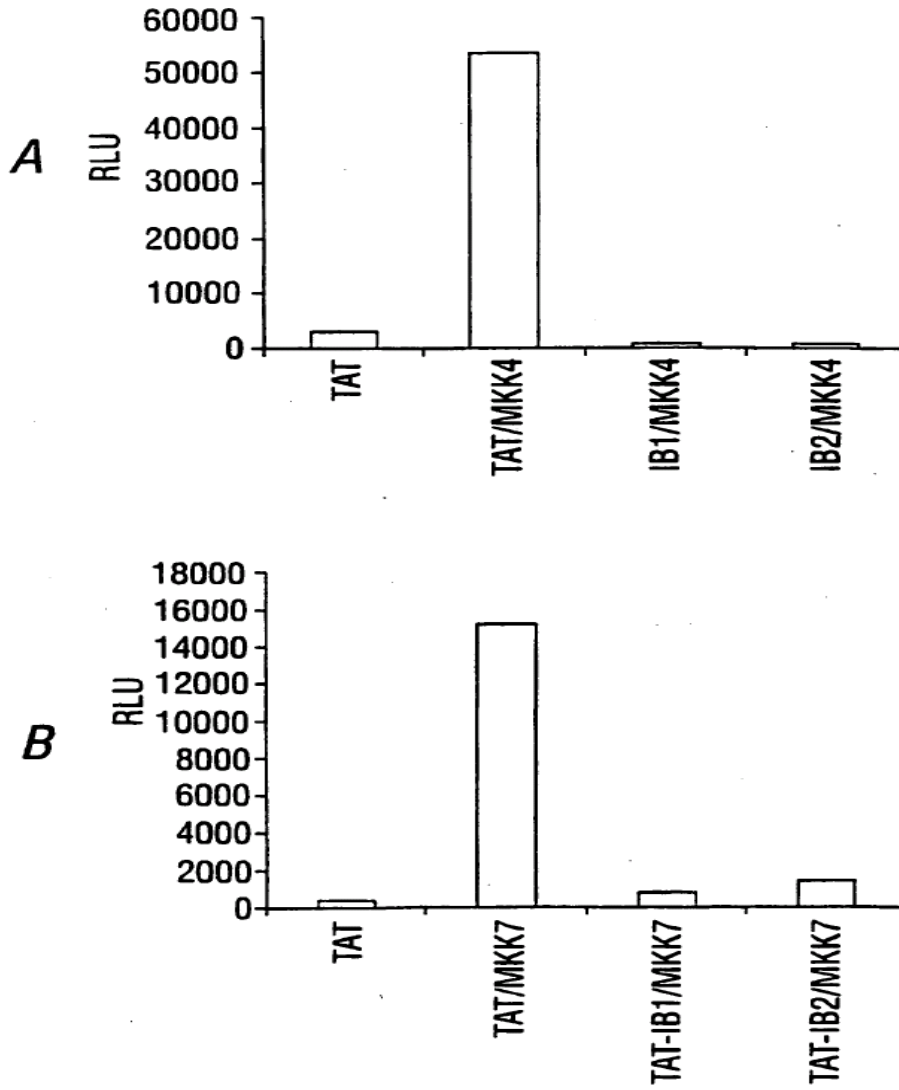


FIG. 6

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

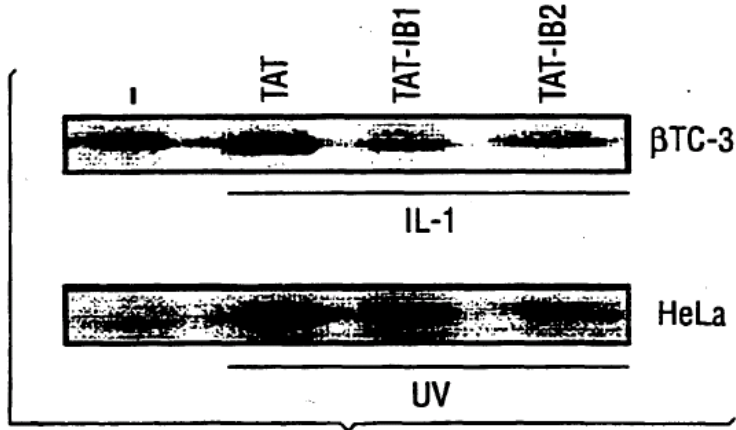


FIG. 11

Supresión de la Fosforilación del Factor de Transcripción JNK por los Péptidos L-TAT-IB1

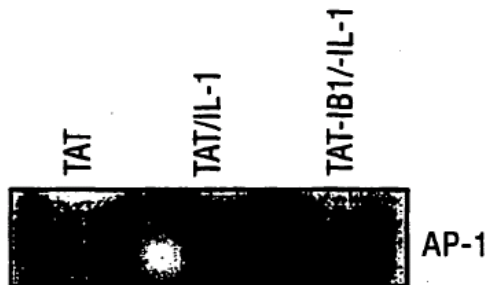


FIG. 8

El péptido D-TAT-IB1 reduce la apoptosis inducida por IL-1 en células -3

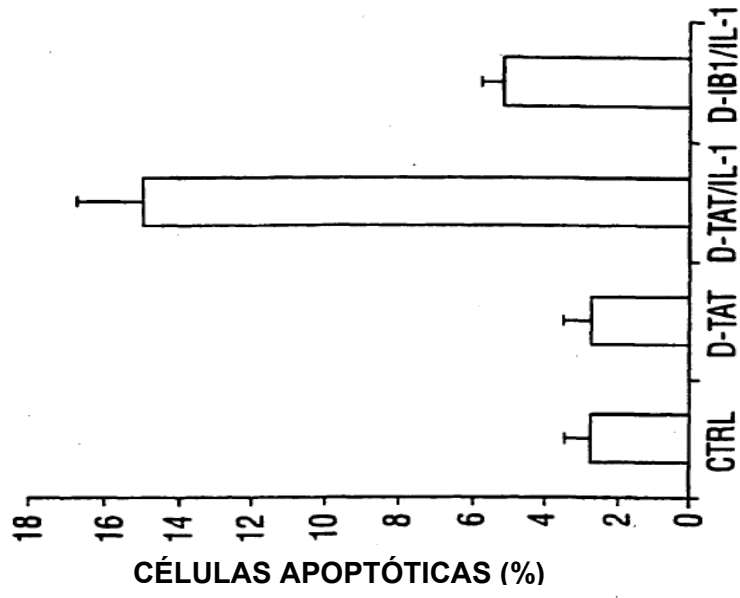


FIG. 7

Inhibición de la Muerte de Células-β Pancre Inducida por IL-1β por P -IB

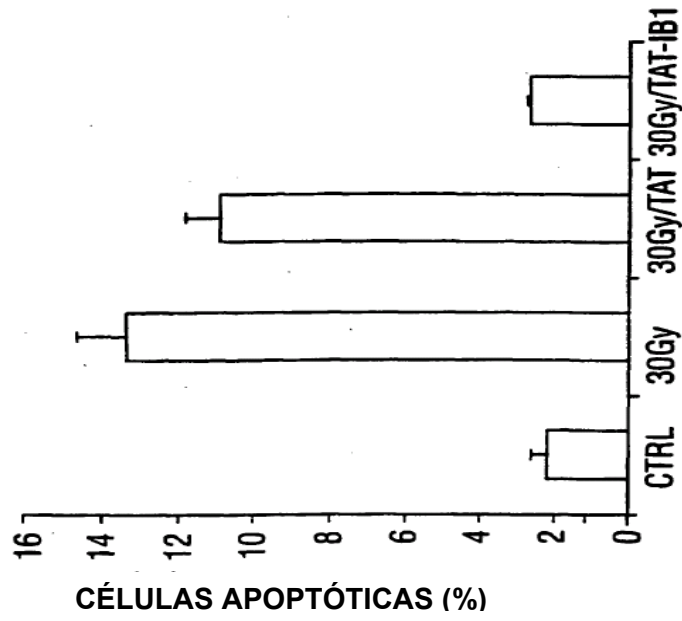


FIG. 9

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

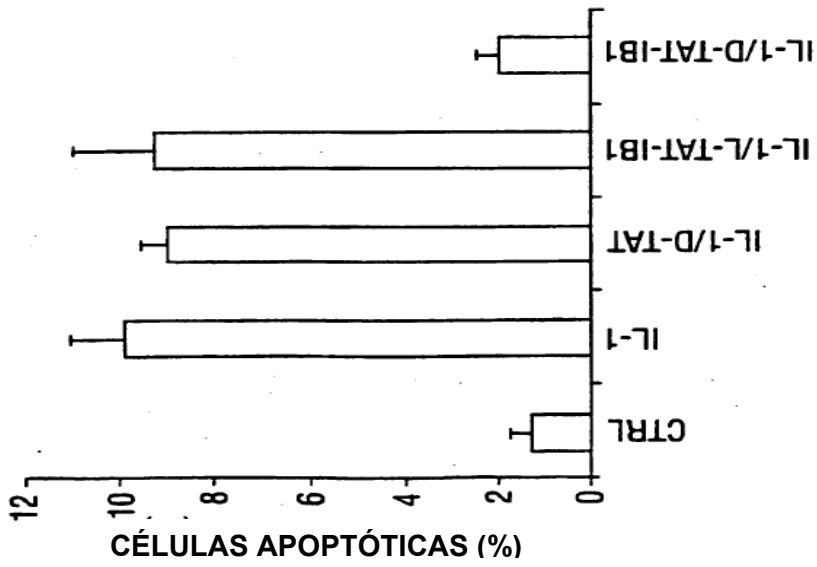


FIG. 10

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

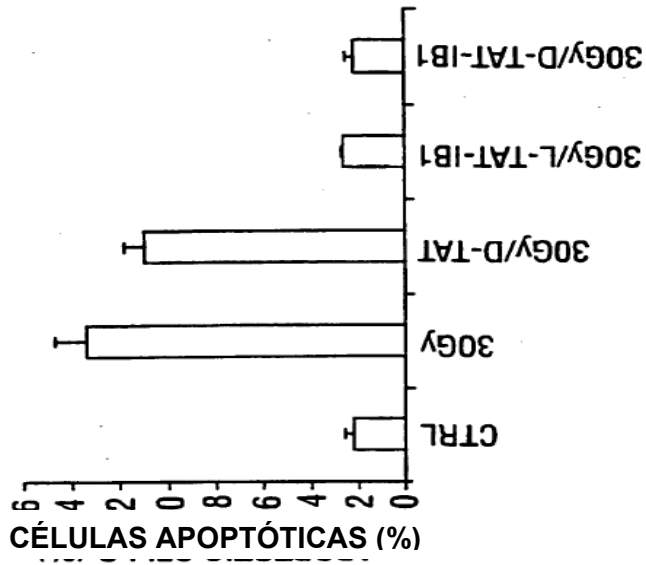


FIG. 12 Radioprotección contra la Radiación Ionizante por los Péptidos TAT-IB1

