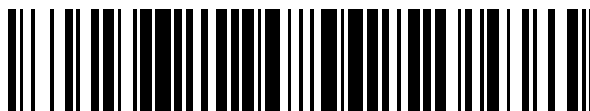


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 824**

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: **07021046 .3**
96 Fecha de presentación: **12.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1905830**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

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:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

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 2 383 824 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

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

5 La quinasa c-Jun amino terminal (JNK) es un miembro del grupo activado por estrés de las quinasas proteicas mitógeno-activadas (MAP). Estas quinasas están implicadas en el control del crecimiento y la diferenciación celular, y, en general, en la respuesta de las células a los estímulos ambientales. La ruta de transducción de las señales JNK se activa en respuesta al estrés ambiental y mediante el empleo de diversos tipos de receptores de la superficie celular. Estos receptores pueden incluir receptores de citoquinas, receptores de serpentininas y receptor tirosina-quinasa. En las
10 células de mamíferos, la JNK está involucrada en procesos biológicos tales como la transformación oncogénica y en la mediación de respuestas adaptativas al estrés ambiental. La JNK también se asocia a la modulación de las respuestas inmunes, incluyendo la maduración y la diferenciación de las células inmunes, así como a la puesta en marcha de la muerte celular programada en células identificadas para la destrucción por el sistema inmune.

15 En Bonny y col. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 4, p. 1843 - 1846, 1998) se describe el clon de expresión de un cADN de rata que codifica una proteína nuclear derivada de JIP-1 a partir de una librería de cADN de células pancreáticas β , al cual los autores denominan IB1 (por Islet-Brain 1). El cADN de IB1 codifica una proteína de 714 aminoácidos que difiere de JIP-1 en la inserción de 47 aminoácidos en la parte carboxilo terminal de la proteína. El resto de los 667 aminoácidos son, en un 97%, idénticos a JIP-1. Los datos demostraron que IB1 es una proteína ADN-enlazante relacionada con JIP-1 que es altamente expresada en las células pancreáticas β y que funciona como un
20 transactivador del gen GLUT2.

La publicación de patente internacional WO 98/49188 se refiere igualmente a la proteína de interacción con JNK1 (JIP-1), a un inhibidor de la proteína JNK1, a un método para el tratamiento de una condición patológica o de prevención de la misma en un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptidos, péptidos, péptidos miméticos o ácidos nucleicos de JIP-1.

25 La publicación de patente internacional WO 1994/004686, de Biogen Inc., se refiere al suministro de moléculas biológicamente activas, tales como polipéptidos y ácidos nucleicos, transportadoras al citoplasma y al núcleo celular *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de nuevos polipéptidos de transporte que comprenden una o más partes de la proteína HIV TAT y que se unen de forma covalente a las moléculas transportadoras. Los polipéptidos de transporte de esta invención se caracterizan por la presencia de la región básica de TAT (aminoácidos 49 - 57), la ausencia de la región de
30 cisteína de TAT (aminoácidos 22 - 36) y la ausencia del dominio carboxiterminal que codifica el exón-2 de TAT (aminoácidos 73 - 86) de la proteína TAT nativa. La ausencia de la región tica en cisteína que se encuentra en las proteínas TAT convencionales soluciona los problemas de la falsa transactivación y de la agregación de disulfuros.

35 Bessalle y col. (FEBS Letters, Vol. 274, No. 12, p. 151 - 155, 1990) describen la síntesis de 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.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de péptidos que son inhibidores eficaces de las proteínas 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).

45 La invención comprende péptidos quiméricos que incluyen un inhibidor peptídico de JNK enlazado a un péptido de tráfico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 10, que puede emplearse para dirigir un péptido en el cual está presente a una localización celular deseada. La secuencia de tráfico se puede utilizar para dirigir el transporte del péptido a través de la membrana plasmática. Alternativamente o además, el péptido de tráfico se puede utilizar para dirigir el péptido hacia el lugar intracelular deseado, por ejemplo al núcleo.

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

50 También están incluidas en la invención las composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos de unión de JNK, así como anticuerpos que reconocen específicamente los péptidos de unión de JNK.

En otro aspecto, la invención incluye el uso de los péptidos quiméricos de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar patofisiologías asociadas a la activación de JNK en una o más células. Por ejemplo, las células diana pueden ser células animales, humanas o microorganismos, cultivados. El suministro puede llevarse a cabo *in vivo* mediante la administración del péptido quimérico a un individuo, al cual se aplica con fines diagnósticos, preventivos o terapéuticos. Las células diana pueden ser células *in vivo*, es decir células que forman parte de los órganos o tejidos de animales vivos o humanos, o microorganismos encontrados en animales vivos o humanos.

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

Salvo definido de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un especialista en el campo de la técnica al que pertenece esta 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 Fig. 1A-C: son diagramas que muestran las alineaciones de las regiones de dominios JBD conservadas en los factores de transcripción indicados.
- Fig. 2: diagrama que muestra las alineaciones de péptidos genéricos de fusión TAT-IB.
- Fig. 3: histograma que describe la inhibición de la muerte de células- β por el dominio JBD mínimo de 23 aminoácidos de tamaño de IB1 en comparación con el dominio de JBD completo, de 280 aminoácidos.
- 25 Fig. 4: ilustración que demuestra los efectos de los péptidos TAT, TAT-IB1 y TAT-IB2 sobre 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 de dosis-respuesta similares a los del Panel A.
- 30 Fig. 5: histograma que describe la inhibición de la fosforilación de L-TAT-IB por JNK recombinantes. El panel A muestra la inhibición de 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 de 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 del pancreas inducida por IL-1 β por los péptidos L-TAT-IB.
- 35 Fig. 8: histograma que describe la inhibición a corto plazo de la muerte de células- β del pancreas 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 de pancreas inducida por IL-1 β por los péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1.
- 40 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.
- Fig. 11: ilustración de la modulación de la actividad de la quinasa JNK por los péptidos L-TAT, TAT-IB1 y D-TAT-IB1.
- 45 Fig. 12: gráficos que describen los efectos protectores de los péptidos TAT-IB1 en el ratón. El panel A muestra el efecto de la irradiación sobre el peso. El panel B muestra el efecto de la irradiación sobre el estado de edema y eritema.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, 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. Además, el descubrimiento proporciona la utilización y las composiciones farmacéuticas para tratar patofisiologías asociadas a la señalización de JNK.

5 Los péptidos inhibidores de JNK se identificaron mediante la inspección de alineaciones de secuencias entre los Dominios de Unión de kJNK en varias proteínas de unión a insulina (IB). Los resultados de esta alineación se muestran en las Figs. 1A-1C. La Fig. 1A describe la región de más alta homología entre los JBDs de IB1, IB2, c-Jun y ATF2. El panel B describe la alineación de las secuencias de aminoácidos de los JBDs de IB1 e IB2. Los residuos totalmente conservados se indican mediante asteriscos, mientras que los residuos cambiados a Ala en el vector GFP-JBD_{23Mut} se indican mediante círculos abiertos. 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. En el ejemplo mostrado, 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 de humanos, ratón y rata son idénticas en los Paneles B y C.

10 La comparación de las secuencias entre los dominios de unión de JNK de IB1 [SEQ ID NO:17], IB2 [SEQ ID n° 3], c-Jun [SEQ ID n°:19] y ATF2 [SEQ ID n°:20] revelaron una secuencia de 8 aminoácidos parcialmente conservados (FIG. 1A). Una comparación de los JBDs de IB1 e IB2 reveló además dos bloques de siete y tres aminoácidos que están altamente conservados entre las dos secuencias. Estos dos bloques están contenidos en una secuencia peptídica de 23 aminoácidos en IB1 [SEQ ID n°:1] y 21 aminoácidos en IB2 [SEQ ID n°:2].

15 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 cardiacas y cardiovasculares y algunos cánceres (por ejemplo, transformación *Bcr-AbI*).

20 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.

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

30 Los polinucleótidos proporcionados por la presente invención se pueden emplear para expresar péptidos recombinantes con el fin de su análisis, caracterización o uso terapéutico, como marcadores para tejidos en los cuales se expresan preferentemente los péptidos correspondientes (tanto de forma constitutiva como en cualquier etapa particular de diferenciación o desarrollo tisular o en estados de enfermedad). Otros usos de los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, marcadores de peso molecular en el análisis de electroforesis en gel de ácidos nucleicos.

35 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.

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	SDQAGLTLR LTTPRHKHPE E
L-IB (genérico)	5	19	XRPTTLXLXX XXXXXQDS/TX
D-IB (genérico)	6	19	XS/TDQXXXXXX XLXLTPRX
L-TAT	7	10	GRKKRRQRRR
D-TAT	8	10	RRRQRRKRG
L-genérico-TAT	9	17	XXXXRKKRRQ RRRXXXX
D-genérico-TAT	10	17	XXXXRRRQRR KKRXXXX
L-TAT-IB1	11	35	GRKKRRQRRR PPDYRPKRP TTLNLFPQVP RSQDT
L-TAT-IB2	12	33	GRKKRRQRRR PPEEPHKHRP TTLRLTTLGA QDS
L-TAT-IB (genérico)	13	42	XXXXXXXXRKK RRQRRXXXX XXXRPTTLX LXXXXXXXXQD S/TX
D-TAT-IB1	14	35	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTDPPRRRQR RKKRG
D-TAT-IB2	15	33	SDQAGLTLR LTTPRHKHPE EPPRRRQRRK KRG
D-TAT-IB (genérico)	16	42	XT/SDQXXXXXX XLXLTPRXX XXXXXXRRRQ RRKKRXXXXX XX
IB1-largo	17	29	PGTGC GDYR PKRPTTLNLF PQVPRSQDT
IB2-largo	18	27	IPSPSVEEPH KHRPTTLRLT TLGAQDS
c-Jun	19	29	GAYGYSNPKI LKQSM TLNLA DPGVNLKPH
ATF2	20	29	TNEDHLAVHK HKHEMTL KFG PARNSVIV

Péptidos inhibidores de JNK

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un péptido inhibidor de JNK. El término "péptido" no implica una longitud concreta. Sin embargo, 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. En una realización, el péptido inhibidor de JNK se une a JNK. En otra realización, el péptido inhibe la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun, ATF2 o Elk1.
- 10 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-EEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS-COOH [SEQ ID n°: 2].

- 15 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.

5 En una realización, un péptido retro-inverso D tiene la secuencia $\text{NH}_2\text{-TDQSRPVQPFNLTPRKPRYTD-COOH}$ [SEQ ID n°: 3]. En otra realización, el péptido retro-inverso D tiene la secuencia $\text{NH}_2\text{-SDQAGLTLRLTTPRHKHPEE-COOH}$ [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*.
10 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.

En otra realización, un péptido inhibidor de JNK según la invención incluye la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RPTTLXLXXXXXXXXQDS/T-X}_n\text{-COOH}$ [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 otra realización, el péptido IB genérico puede ser un péptido retro-inverso D que tiene la secuencia $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-S/TDQXXXXXXXXLXLTPR-X}_n\text{-COOH}$ [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].

20 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).
25
30
35

La presente invención además se refiere a los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de unión a JNK que tienen la forma L de aminoácidos, por ejemplo aquellos L-péptidos indicados en la Tabla 1, así como los complementos de estas secuencias. Fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican los péptidos inhibidores de JNK incluyen el ácido nucleico IB1 humano (y las secuencias de proteínas codificadas), disponible con los números de acceso al GenBank AF074091 y AAD20443, respectivamente. Otras fuentes incluyen ácido nucleico IB1 de rata y las secuencias de proteínas mostradas con los números de acceso al GenBank AF108959 y AAD22543 respectivamente. El ácido nucleico IB2 humano y las secuencias de proteínas se muestran con el n° de acceso al GenBank AF218778 y se incorpora también aquí como referencia en su totalidad.
40
45

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

50 Para la expresión recombinante de uno o más péptidos inhibidores de JNK, el ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido se puede insertar en un vector de expresión apropiado (es decir en un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica el péptido insertado). En algunas realizaciones, los elementos reguladores son heterólogos (es decir, no el promotor genético nativo). Alternativamente, las señales transcripcionales y de traducción necesarias pueden ser suministradas también por el promotor nativo para los genes y/o sus regiones flanqueantes.
55

Se puede utilizar una variedad de sistemas huésped-vector para expresar la(s) secuencia(s) de codificación del péptido. Estos incluyen, pero no se limitan a, (i) sistemas celulares de mamíferos infectados por el virus vaccinia, adenovirus y similares; (ii) sistemas celulares de insecto infectados por baculovirus y similares; (iii) levaduras que contienen vectores de levadura o (iv) bacterias transformadas por bacteriófagos, ADN, ADN plásmido o ADN cósmido. Según el sistema huésped-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de un número de elementos adecuados de transcripción y traducción.

Las secuencias promotoras/intensificadoras dentro de los vectores de expresión pueden utilizar secuencias reguladoras de plantas, animales, insectos u hongos, tal como se proporcionan en la invención. Por ejemplo, se pueden emplear elementos promotores/intensificadores procedentes de levaduras y de otros hongos (por ejemplo, el promotor GAL4, el promotor de alcohol-deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol-quinasa, el promotor de fosfatasa alcalina). Alternativa o adicionalmente pueden incluir regiones de control transcripcional de animales, por ejemplo, (i) las regiones de control del gen de la insulina activas dentro de las células- β pancreáticas (véase por ejemplo Hanahan y col., 1985, Nature 315: 115-122); (ii) la región de control del gen de la inmunoglobulina activa dentro de las células linfoides (véase por ejemplo Grosschedl y col., 1984, Cell 38: 647-658); (iii) la región de control del gen de la albúmina activa dentro del hígado (véase por ejemplo Pinckert y col., 1987, Genes and Dev 1: 268-276); (iv) la región de control del gen de la proteína básica de la mielina activa dentro de las células de oligodendrocitos del cerebro (véase por ejemplo Readhead y col., 1987, Cell 38: 703-712); y (v) la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas activa dentro del hipotálamo (véase por ejemplo Mason y col., 1986, Science 234: 1372-1378) y similares.

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

Se puede seleccionar una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias de interés insertadas, o que modifique o procese péptidos expresados codificados por las secuencias de la manera específica deseada. Además, la expresión procedente de ciertos promotores puede ser intensificada en presencia de ciertos inductores en una cepa huésped seleccionada, facilitando así el control de la expresión de un péptido construido genéticamente. Además, distintas células huésped poseen mecanismos característicos y específicos para la modificación y procesamiento de traducción y post-traducción (por ejemplo glicosilación, fosforilación y similares) de los péptidos expresados. Por tanto, se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la obtención de la modificación y el procesamiento deseados del péptido extraño. Por ejemplo, la expresión del péptido dentro de un sistema bacteriano se puede utilizar para producir un péptido de núcleo no glicosilado, mientras que la expresión dentro de las células de mamíferos asegura la glicosilación "nativa" de un péptido heterólogo. Para los aminoácidos, los derivados, fragmentos y análogos proporcionados aquí se definen como secuencias de al menos 4 aminoácidos (contiguos), longitud suficiente para tener en cuenta el reconocimiento específico de un epítipo.

La longitud de los fragmentos es inferior a la longitud del ácido nucleico o polipéptido de longitud completa correspondiente del que procede el péptido inhibidor de JNK o el ácido nucleico que codifica el mismo. Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa u otros distintos a los de una longitud completa si el derivado o análogo contiene un aminoácido o ácido nucleico modificado. Los derivados o análogos de los péptidos inhibidores de JNK incluyen, por ejemplo, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los péptidos, en algunas realizaciones, en al menos un 30%, 50%, 70%, 80%, o 95%, 98% o incluso un 99% de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se comparan con una secuencia alineada en la que la alineación se realiza mediante un programa informático por homología conocido en la técnica. Por ejemplo la identidad de secuencias se puede medir utilizando un software de análisis de secuencias (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) con los parámetros por defecto aquí incluidos.

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

considerar también conservadora. Los grupos de sustitución conservadora preferentes son aspartato-glutamato; asparagina-glutamina; valina-leucina-isoleucina; alanina-valina; fenilalanina-tirosina; y lisina-arginina.

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

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

15 La presente invención proporciona asimismo homólogos de especies de los polinucleótidos y péptidos descritos. "Variante" se refiere a un polinucleótido o a un polipéptido que es diferente del polinucleótido o polipéptido de la presente invención, pero que conserva las propiedades esenciales del mismo. Generalmente, las variantes son globalmente muy similares y en muchas regiones idénticas al polinucleótido o al polipéptido de la presente invención. Las variantes pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, en las no codificadoras o en ambas.

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

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

35 Una alta rigurosidad puede incluir, por ejemplo, el Paso 1: se pretratan filtros que contienen ADN durante 8 horas hasta una noche a 65°C en un tampón compuesto de 6X de SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Paso 2: se hibridizan los filtros durante 48 horas a 65°C en la mezcla de prehibridación anterior, a la que se añaden 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 5-20 x 10⁵ cpm de sonda ³²P-marcada. Paso 3: se lavan los filtros durante 1 hora a 37°C en una solución que contiene 2X de SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01% y BSA al 0,01%. Seguidamente se lavan en 0,1X de SSC a 50°C durante 45 minutos. Paso 4: se autorradiografían los filtros. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de alta rigurosidad que se pueden utilizar. Véase por ejemplo, Ausubel y col., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY; y Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

45 Las condiciones rigurosidad moderadas pueden incluir lo siguiente: Paso 1: se pretratan filtros que contienen ADN durante 6 horas a 55°C en una solución que contiene 6X de SSC, 5X de solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Paso 2: se hibridizan los filtros durante 18-20 horas a 55°C en la misma solución con la adición de 5-20 x 10⁶ cpm de sonda ³²P-marcada. Paso 3: se lavan los filtros a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene 2X de SSC, SDS al 0,1%, luego se lavan dos veces durante 30 minutos a 60°C en una solución que contiene 1X de SSC y SDS al 0,1%. Paso 4: se secan los filtros y se exponen a la autorradiografía. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de rigurosidad moderada que se pueden utilizar. Véase por ejemplo, Ausubel y col., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY; y Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

55 La baja rigurosidad puede incluir: Paso 1: se pretratan filtros que contienen ADN durante 6 horas a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, 5X de SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Paso 2: se hibridizan los filtros durante 18-20 horas a

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

10 Péptidos Quiméricos que incluyen un Dominio Inhibidor de JNK y un Dominio de Tráfico

La invención proporciona un péptido quimérico que incluye un primer y un segundo dominios. El primer dominio incluye una secuencia de tráfico que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID n° 8 o 10, 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.

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

El péptido de tráfico procede de la secuencia conocida de translocación de membrana 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.

La secuencia TAT puede estar enlazada al extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia inhibidora de JNK. Se puede añadir una bisagra de dos residuos prolina entre la TAT y el péptido inhibidor de JNK para crear el péptido de fusión total. 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 N°: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.

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

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

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

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 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 la multiplicación de polipéptidos. Los cambios en la multiplicación de polipéptidos se minimizan cuando la sustitución es química y estéricamente similar a la cisteína. Por estas razones, se prefiere la serina como sustitución para la cisteína. Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, se puede introducir un residuo de cisteína en una secuencia de aminoácidos polipeptídicos con propósitos de reticulación. Cuando se introduce un residuo de cisteína, se prefiere la introducción en o cerca del extremo amino o carboxi. Se dispone de métodos convencionales para estas modificaciones de la secuencia de aminoácidos cuando el polipéptido de interés se produce mediante síntesis química o por expresión de ADN recombinante.

El acoplamiento de los dos constituyentes se puede realizar a través de un agente de acoplamiento o por 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-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con los grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación útiles para este propósito incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma enlaces de reticulación 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 bismaleimidoheptano ("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 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 hidrofílica, 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 reactivo de reticulación segmentable permite que la parte de carga se separe del polipéptido de transporte después de su suministro en la célula diana. El enlace directo a disulfuro puede ser también útil.

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).

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).

- 5 Alternativamente, el péptido quimérico se puede producir como un péptido de fusión que incluye la secuencia de tráfico y la secuencia inhibidora de JNK, que se puede expresar adecuadamente en células huésped apropiadas conocidas. Los péptidos de fusión, tal como se describen aquí, pueden formarse y utilizarse de manera análoga o fácilmente adaptable a partir de técnicas de ADN recombinante estándar, tal como se ha descrito anteriormente.

Utilización de los compuestos de la presente invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de trastornos asociados a una actividad de JNK no deseada

- 10 La invención incluye también el uso de los compuestos de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos proliferativos de células asociados a la activación de JNK en un sujeto mediante la administración al mismo de un compuesto terapéutico biológicamente activo péptido quimérico de la invención (en adelante "producto terapéutico"). El sujeto puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo un ser humano, primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo.

El término "producto terapéutico" incluye, por ejemplo, uno o más de los péptidos inhibidores de JNK.

- 15 El término "terapéuticamente eficaz" significa que por ejemplo la cantidad de péptido inhibidor que se emplea es suficiente para mejorar el trastorno asociado a JNK. El término "trastorno proliferativo de células" indica poblaciones de células malignas así como no malignas que aparecen frecuentemente diferenciándose morfológica y funcionalmente del tejido circundante. Por ejemplo, el método puede servir para tratar malignidades de los distintos sistemas orgánicos, en las que con frecuencia se ha demostrado la activación de JNK, por ejemplo, en pulmón, pecho, tejido linfoide, tracto gastrointestinal y genito-urinario, así como para tratar adenocarcinomas que incluyen malignidades tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, carcinoma de células pulmonares no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. Se incluyen también los cánceres con transformaciones oncogénicas Bcr-Abl que claramente requieren la activación de JNK.

- 25 Los compuestos son útiles también en el tratamiento de enfermedades proliferativas de células no-malignas o asociadas al aspecto inmunológico, tales como la psoriasis, pénfigo vulgar, síndrome de Behcet, síndrome de sufrimiento respiratorio agudo (ARDS), enfermedad cardíaca isquémica, síndrome de postdiálisis, leucemia, artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, vasculitis, shock séptico y otros tipos de inflamación aguda, así como histiocitosis lipídica. Son especialmente preferentes los trastornos inmunopatológicos. Esencialmente, todo trastorno que esté ligado etiológicamente a la actividad de JNK-quinasa se consideraría susceptible de tratamiento.

- 30 El tratamiento incluye la administración de un reactivo que modula la actividad de JNK-quinasa. El término "modula" incluye la supresión de la expresión de JNK cuando está sobreexpresado. Incluye asimismo la supresión de la fosforilación de c-jun, ATF2 o NFAT4, por ejemplo, mediante la utilización de un péptido o más con cualquiera de las SEQs ID nº: 14-16 como inhibidor competitivo del lugar de unión natural de c-jun ATF2 y NFAT4 en una célula. Por tanto, incluye también la supresión de los complejos hetero- y homo-méricos de los factores de transcripción compuestos de c-jun, ATF2 o NFAT4 y sus asociados relacionados, por ejemplo el complejo AP-1 que está compuesto de c-jun, ATF2 y c-fos. Cuando un trastorno proliferativo de células está asociado a la sobreexpresión de JNK, estos péptidos inhibidores supresivos de JNK se pueden introducir en una célula. En algunos casos, "modular" puede incluir el incremento de la expresión de JNK, por ejemplo mediante el uso de un anticuerpo específico del péptido IB que bloquea la unión de un péptido IB a JNK, impidiendo así la inhibición de JNK por el péptido asociado a IB.

- 40 Los péptidos de fusión inhibidores de JNK de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las sustancias mencionadas anteriormente, excipientes, vehículos, tampones estabilizantes farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza 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 parche.

- 45 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 vehículo 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.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o para una inyección en el lugar 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.

5 Cuando se trata de administrar a un individuo un compuesto de polipéptido, péptido u otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención, la administración se realiza preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis se pueda considerar como terapia) suficiente que beneficie al individuo. La cantidad real administrada, así como la velocidad y la duración de la administración, dependerán de la naturaleza y 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.

15 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 es necesaria una dosificación demasiado alta, o cuando no se puede entrar de otro modo en las células diana.

20 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; esto implica dirigir al agente activados a las células por conjugación con un anticuerpo específico celular.

Inmunoensayos

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

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

Ejemplos específicos

Ejemplo 1: Identificación de Péptidos Inhibidores de JNK

45 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 NO:17], IB2 [SEQ ID NO:18], c-Jun [SEQ ID NO:19] y ATF2 [SEQ ID NO:20] definió una secuencia de 8 aminoácidos débilmente conservada (FIG. 1A). 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 NO: 1] y de 21 aminoácidos en IB2 [SEQ ID NO: 2]. Estas secuencias se muestran en la FIG. 1B, las rayas en la secuencia IB2 indican un espacio en la secuencia con el fin de alinear los residuos conservados.

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 NO:7], L-TAT-IB1 [SEQ ID NO: 11] y L-TAT-IB2 [SEQ ID NO: 12], respectivamente. Se sintetizaron también todos los péptidos de fusión TAT de los péptidos retro-inversos D y se designaron D-TAT [SEQ ID NO: 8] y D-TAT-IB1 [SEQ ID NO: 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 en las células interiores del péptido TAT.

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 se protegieron. 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 estreptomycin, 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, 7BD23/IL-1 comparado con JBD280/IL-1). Como controles adicionales, las secuencias mutadas en los residuos de IB1 totalmente conservados tenían una capacidad muy reducida de impedir la apoptosis (FIG. 3, JBD23Mut/IL-1).

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.

Los péptidos L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1, L-TAT-IB2 y D-TAT-IB1 [SEQs ID NO: 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 µM) a cultivos de células βTC -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 marcado con fluoresceína (1µM, 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 marcado con fluoresceína (1µM de BSA, 12 moles de fluoresceína/mol de BSA) no penetró en las células.

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 todos estos péptidos retro-inversos 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

5 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 utilizó en ensayos de quinasa en fase
 10 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 µM) se mezclaron con las quinatas 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 ditiotretol) durante 20 minutos. Las reacciones de las quinatas se iniciaron entonces mediante la adición de 10 mM MgCl₂ y 5 µCi de ³³P-γ-dATP y 1 µg 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 diez
 15 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 µM. 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).
 20

La capacidad de los péptidos D-TAT, D-TAT-IB1 y L-TAT-IB1 (estudio con dosificación de 0-250 µM) 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).

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

Se evaluaron los efectos de los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ó L-TAT-IB2 sobre las JNK activadas por estímulos estresantes utilizando GST-Jun para reducir las JNK procedentes de células HeLa irradiadas con luz UV o células βTC
 30 tratadas con IL-1β. Se cultivaron células βTC tal como se ha descrito anteriormente. Se cultivaron las células HeLa en un medio DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 µg/ml de estreptomocina, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM de glutamina. Una hora antes de utilizarlas para la preparación del extracto celular, se activaron células βTC con IL-1β 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 βTC-3 tratadas con IL-1β, extrayendo los cultivos celulares en un tampón de lisis (20 mM Tris-acetato, 1 mM EGTA, Triton-X-100 al 1%, 10 mM p-nitrofenilfosfato, 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM β-glicerofosfato, 1 mM ditiotretol). Se eliminaron
 35 los residuos por centrifugación durante cinco minutos a 15.000 rpm en un rotor SS-34 Beckman. Se incubaron cien µg de extractos durante una hora a temperatura ambiente con un µg de GST-Jun (aminoácidos 1-89) y 10 µl de perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Después de cuatro lavados con el tampón de extracción, se resuspendieron las perlas en el mismo tampón complementado con los péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2 (25 µM) durante 20 minutos. Las reacciones de las quinatas se iniciaron entonces mediante la adición de 10 mM de MgCl₂ y 5 µCi de ³³P-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).
 40

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

45 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 reportero 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 quinatas directamente aguas arriba MKK4 y MKK7 (véase, Whitmarsh y col., Science 285: 1573 (1999)). Brevemente, se transfectaron 3 x 10⁵ 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 reportero 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
 55 tarde por medio del "Sistema del Doble Reportero" 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-1 β mediante Péptidos TAT-IB

5 Investigamos los efectos de los péptidos L-TAT-IB sobre la promoción de la apoptosis de células- β pancreáticas provocada por IL-1 β . Se incubaron cultivos celulares de β TC-3 durante 30 minutos con 1 μ M de los péptidos L-TAT-IB1 o L-TAT-IB2, seguido de 10 ng/ml de IL-1 β . Se realizó una segunda adición del péptido (1 μ M) 24 horas más tarde. Se contaron las células apoptóticas después de dos días de incubación con IL-1 β 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
10 inducida por IL-1 β de las células β TC-3 cultivadas dos días en presencia de IL-1 β .

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

Ejemplo 9: Síntesis de un Péptido Retro-Inverso Total D

Los péptidos de la invención pueden ser péptidos con aminoácidos D totales sintetizados al revés para prevenir la proteólisis natural (es decir, péptidos retro-inverso totales D). Un péptido retro-inverso total D de la invención
20 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 que 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-
25 inverso sea exactamente contraria a la secuencia en el péptido seleccionado que sirve de modelo. Para ilustrarlo, si la proteína TAT natural (formada por L-aminoácidos) tiene la secuencia GRKKRRQRRR [SEQ ID NO:7], el análogo de péptido retro-inverso de este péptido (formado por D-aminoácidos) tendrá la secuencia RRRQRRKKRG [SEQ ID NO:8]. Son conocidos en la técnica los procedimientos para sintetizar una cadena de D-aminoácidos para formar péptidos retro-inversos. Véase por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693
30 (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
35 "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-Inverso Totales D

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

Se analizó la inhibición de la muerte de células- 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 (1 μ M), luego se añadió IL-1 β (10 ng/ml). Se contaron entonces las células
45 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
50 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).

5 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 PI y Hoechst 33342, tal como se ha descrito anteriormente. Se indica el SEM, n=3. Ambos péptidos L-TAT-IB1 y D-TAT-IB1 fueron capaces de impedir la apoptosis inducida por irradiación en esta línea de células de cáncer de colón 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). Brevemente, se irradiaron los ratones como sigue: se colocaron los ratones en pequeñas cajas de plástico con la cabeza fuera de la caja. Se colocaron los animales de espaldas bajo el irradiador y 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).

Equivalentes

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.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido quimérico que comprende un primer dominio y un segundo dominio enlazados por un enlace covalente, comprendiendo el primer dominio una secuencia de tráfico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID nº 8 o 10 y que dirige el péptido quimérico a través de la membrana plasmática y/o hacia una localización celular deseada, y comprendiendo el segundo dominio una secuencia inhibidora de JNK, donde el péptido inhibidor de JNK tiene una longitud inferior a 280 aminoácidos.
2. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de tráfico aumenta la captación celular del péptido.
- 10 3. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de tráfico dirige la localización nuclear del péptido.
4. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia inhibidora de JNK se une a JNK.
5. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia inhibidora de JNK inhibe la activación de al menos un factor de transcripción diana de JNK.
- 15 6. Péptido según la reivindicación 5, caracterizado porque el factor de transcripción diana de JNK se selecciona de entre el grupo consistente en C-Jun, ATF2 y Elk1.
7. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia inhibidora de JNK altera los efectos inducidos por JNK cuando se introduce en una célula que expresa JNK.
- 20 8. Péptido según la reivindicación 7, caracterizado porque el efecto inducido por JNK se selecciona de entre el grupo consistente en restenosis, transformación oncogénica, maduración y diferenciación de células inmunes, isquemia, reperfusión, hipoxia, hipotermia, hipertermia, apoptosis y respuesta a estímulos estresantes.
9. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido inhibidor de JNK tiene una longitud inferior a 50 aminoácidos.
10. Composición que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, así como un vehículo.
- 25 11. Utilización de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una patofisiología asociada a la activación de JNK en un sujeto, donde la patofisiología se selecciona de entre malignidades que incluyen malignidades de pulmón, pecho, tejido linfóide, tracto gastrointestinal y genito-urinario, leucemia, adenocarcinomas, incluyendo cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, carcinoma de células no-pequeñas de pulmón, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago y cánceres con transformación oncogénica Bcr-Abl, y enfermedades proliferativas de células no-malignas o asociadas al aspecto inmunológico seleccionadas de entre psoriasis, restenosis, vasculitis, pénfigo vulgar, síndrome de Behcet, artritis reumatoide, síndrome de sufrimiento respiratorio agudo (ARDS), enfermedad cardíaca isquémica, síndrome de postdiálisis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, histiocitosis lipídica y shock séptico, diabetes y patofisiologías inducidas por radiación ionizante, radicales libres, agentes que dañan el ADN o luz UV.
- 30 12. Utilización según la reivindicación 11, caracterizada porque el péptido bloquea la activación de al menos un factor de transcripción diana de JNK.
13. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada porque el factor de transcripción diana de JNK se selecciona de entre el grupo consistente en c-Jun, ATF2 y Elk1.
14. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada porque el factor de transcripción diana de JNK es C-Jun.
- 35 15. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada porque el medicamento es adecuado para su suministro por cualquier vía de administración seleccionada de entre el grupo consistente en administración intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral y con parche.

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

```

A
IB2      : IPSPVVEPHKRPTTLRL--TTLGAQDS
IB1      : PGTGGDTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT
c-Jun    : GAYGSNPKILKQSMTTLNLADPVGNLKPH
ATF2     : TNEDHLAVHKKHEMTLKFGPARNDSVIV
      :: **::

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

C
L-TAT   : NH2- GRKKRRQRRR -COOH
L-TAT-IB1 : NH2- GRKKRRQRRRPPDYRPKRPTLNLFPPQVPRSQDT -COOH
L-TAT-IB2 : NH2- GRKKRRQRRRPEEPHKHRPTLNLFPPQVPRSQDT -COOH
D-TAT   : NH2- RRRQRKKRG -COOH
D-TAT-IB1' : NH2- TDQSRPVQPFLNLFTPPKRPRYTDPPRRRQRKKRG -COOH
  
```

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

L-TAT-IB : NH₂- XXXXXXRKRQRQRQRXXXXXXXXXXRPTLXLXXXXXXXXXQDS/TX -COOH
D-TAT : NH₂- XXXRRRQRKRKXXXX -COOH
D-TAT-IB : NH₂- XT/SDXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRQRKRXXXXXXXX -COOH

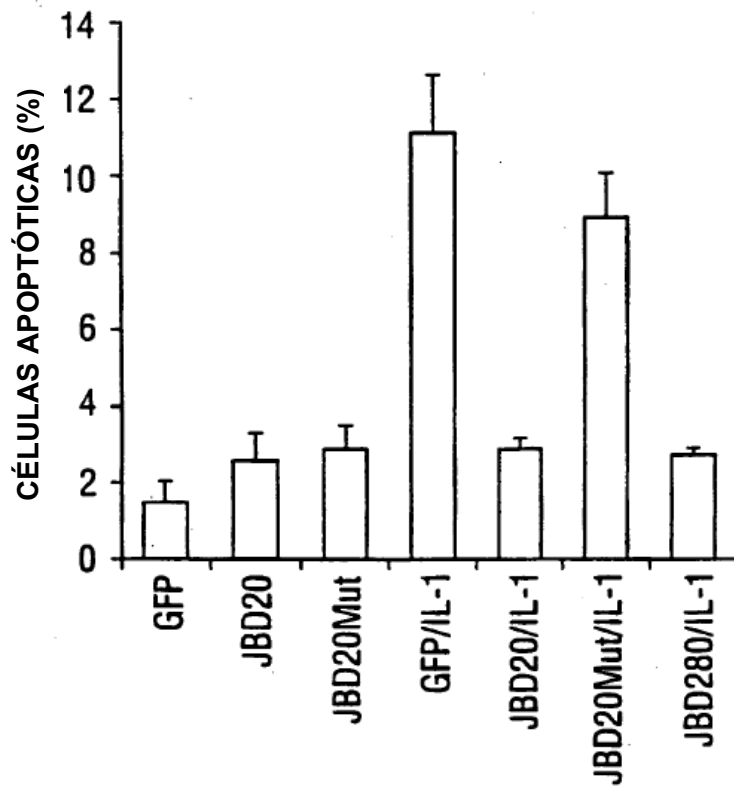
FIG. 3**Efectos del Constructo GFP-JBD₂₃ sobre la Apoptosis de Células- β Pancreáticas**

FIG. 4a

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

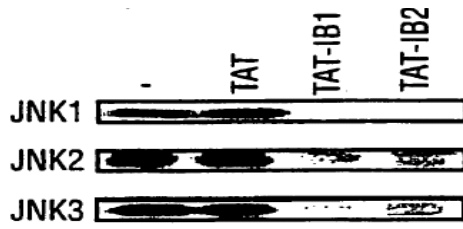


FIG. 4b

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

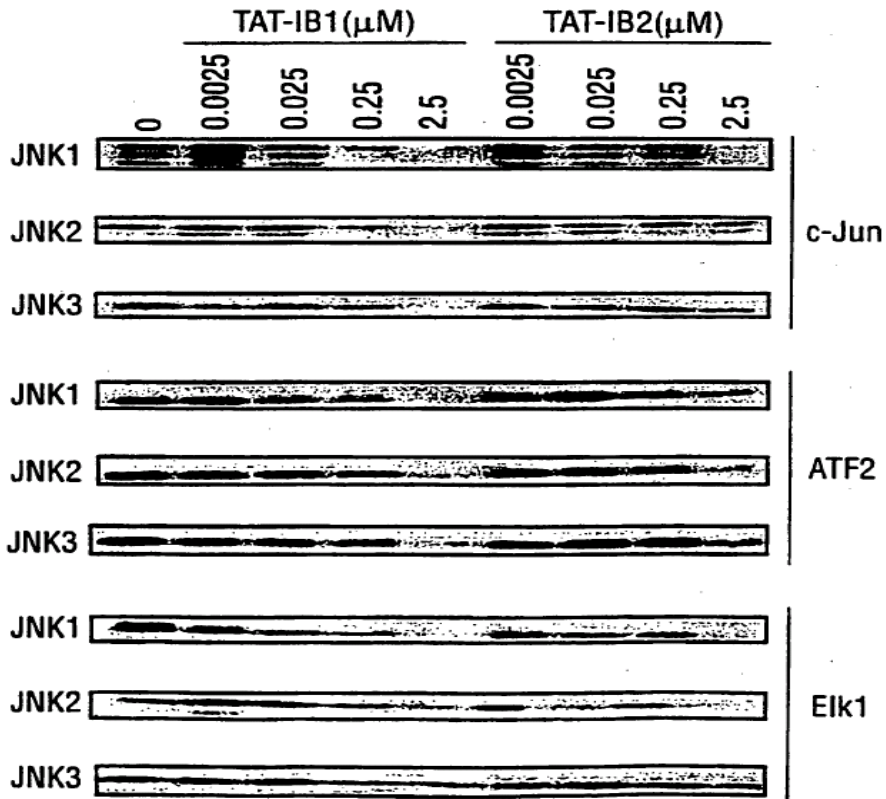


FIG. 5 - Inhibición de la Fosforilación de L-TAT-IB por JNKs Recombinantes

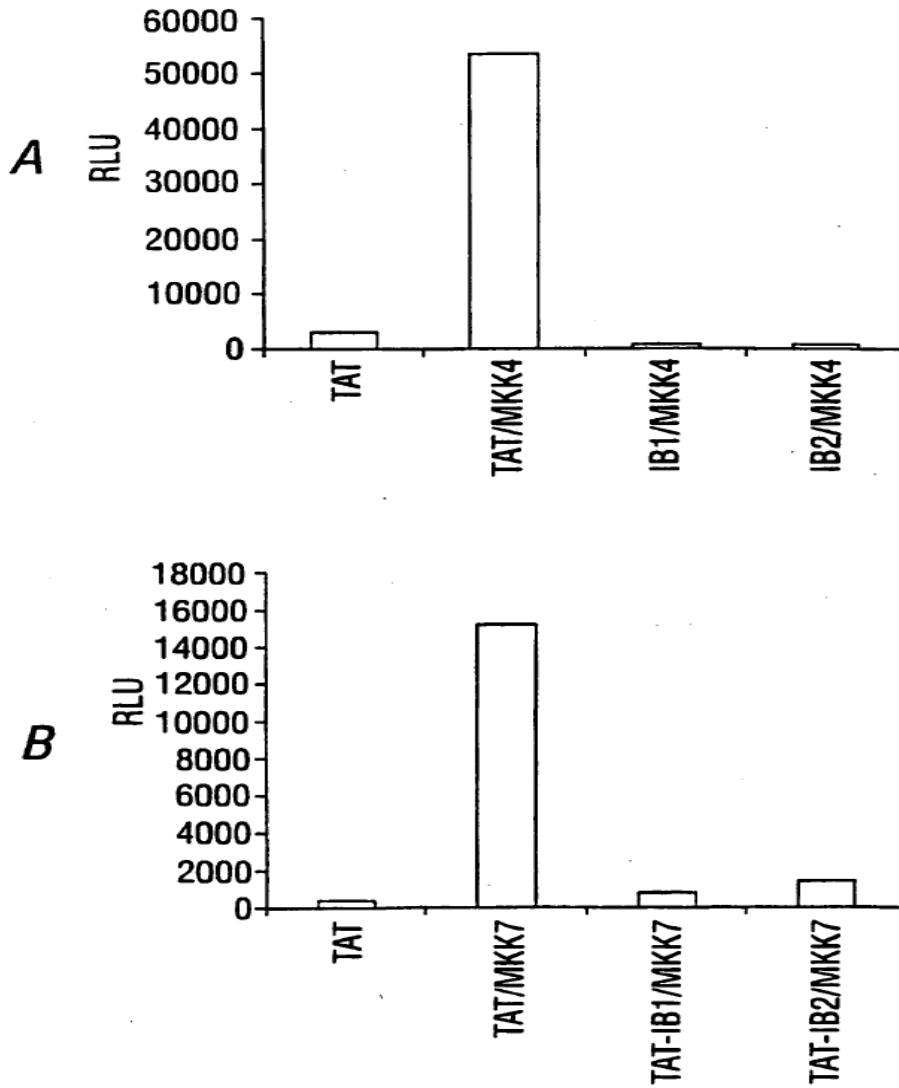


FIG. 6

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

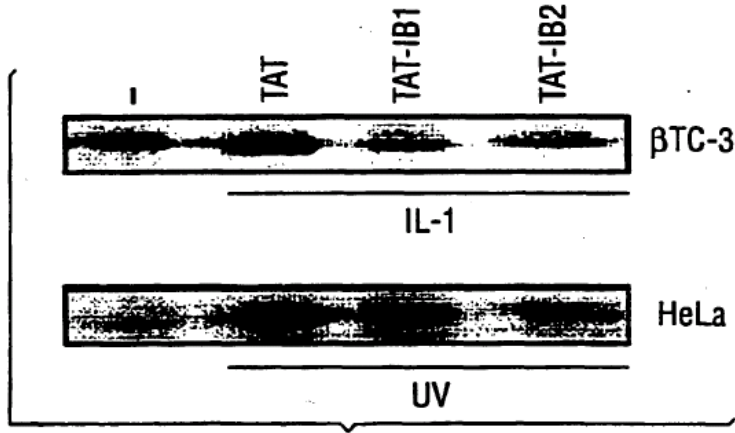


FIG. 11

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

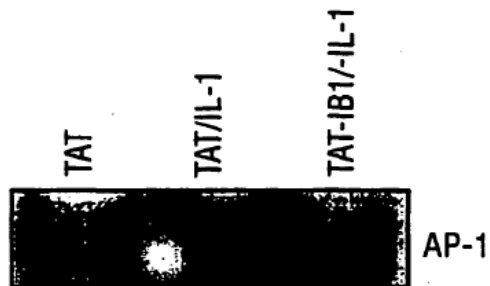


FIG. 8

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

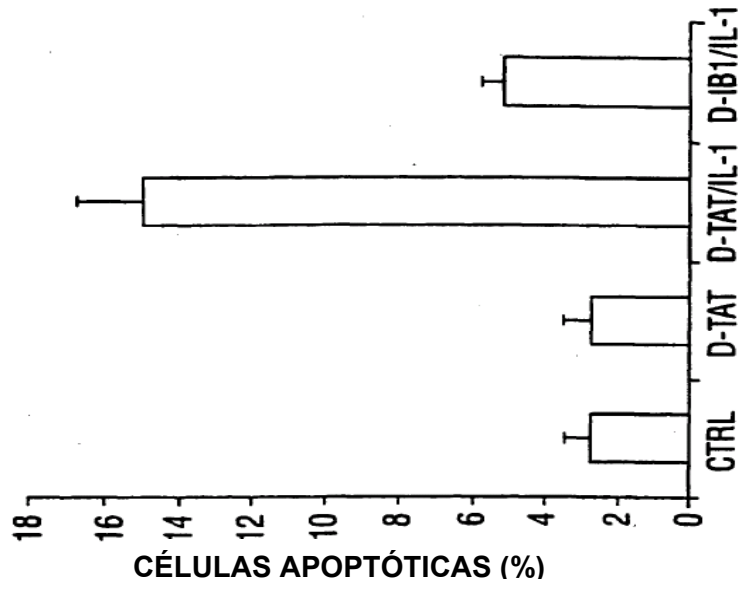


FIG. 7

Inhibición de la Muerte de Células-β Pancre Inducidas por IL-1β por IP -IB

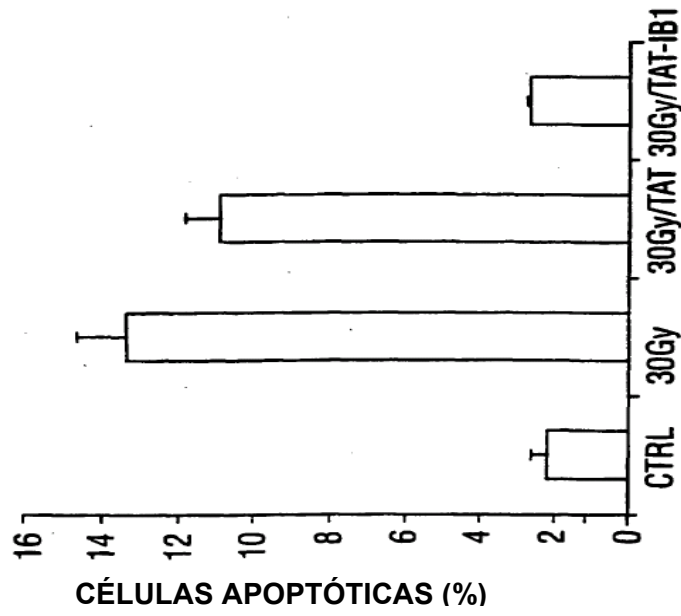


FIG. 9

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

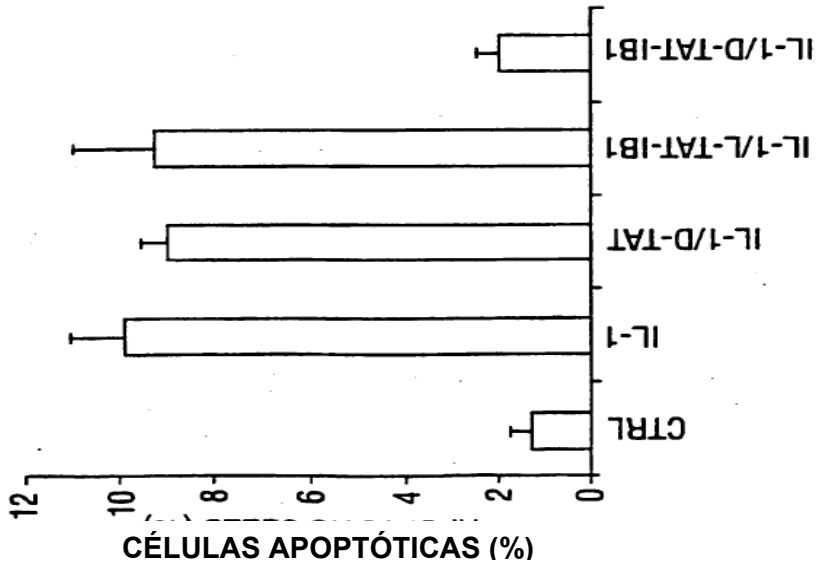


FIG. 10

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

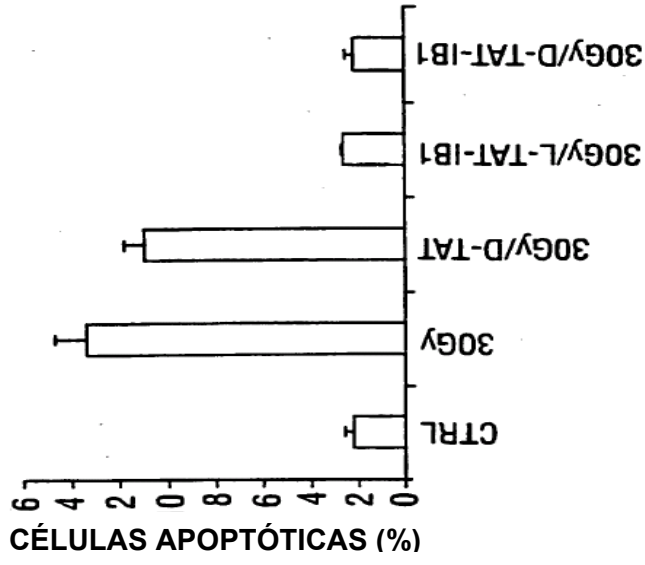


FIG. 12 Radioprotección contra la Radiación Ionizante por los Péptidos TAT-IB1

