

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 380**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2006 E 06830822 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **03.09.2008 EP 1962883**

54 Título: **Medios y métodos para mediar en la interferencia de proteínas**

30 Prioridad:

22.12.2005 EP 05112761

22.12.2005 US 753245 P

01.12.2006 EP 06125189

01.12.2006 US 872079 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.02.2013

73 Titular/es:

VIB VZW (50.0%)

RIJVISSCHE STRAAT 120

9052 ZWIJNAARDE, BE y

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHYMKOWITZ, JOOST y

ROUSSEAU, FREDERIC

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 395 380 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

Medios y métodos para mediar en la interferencia de proteínas

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la proteómica funcional y más en particular al campo de la agregación de proteínas. La invención desvela un método para interferir con la función de una proteína diana y usa una molécula diseñada por el usuario, no natural, designada como interferón, que tiene una especificidad para una proteína diana y que induce agregación en el contacto con dicha proteína diana. La presente invención también desvela tales moléculas de interferón y su uso en aplicaciones terapéuticas.

Antecedentes de la invención

15 La biología está entrando en una apasionante era ocasionada por el aumento de información de todo el genoma. A medida que la secuenciación del genoma y las propuestas genómicas funcionales de alto rendimiento generan más y más datos, los investigadores necesitan nuevas maneras de sacar información relevante biológica con cuidado. La genómica funcional en particular está haciendo un rápido progreso en la asignación de significado biológico a los datos genómicos. La información codificada en el genoma comprende genes, los productos proteínicos de los cuales media la mayoría de las funciones en los organismos y elementos de control. Se pensaba que las proteínas eran los efectores más importantes en las células, aunque recientemente también se han identificado los ARN no codificadores como piezas clave importantes en los procedimientos reguladores.

25 Son centrales diversas cuestiones biológicas clave para continuar los proyectos del genoma y son relevantes para cualquier organismo celular, desde las bacterias a los seres humanos. Un reto es entender cómo actúan e interaccionan los genes que están codificados en un genoma para producir un sistema de vida complejo. Un reto relacionado es determinar la función de todos los elementos de la secuencia en el genoma. El conjunto de herramientas de la genómica funcional ha permitido diversas propuestas sistemáticas que pueden proporcionar las respuestas a unas pocas cuestiones básicas para la mayoría de los genes en un genoma, incluyendo cuándo se expresa un gen, donde se localiza su producto, con qué otros productos génicos interactúa y qué fenotipo resulta si muta un gen. El análisis fenotípico de los mutantes ha sido una propuesta poderosa para determinar la función de los genes. La función de los genes se puede modificar por deleciones de genes, mutagénesis insercional e interferencia de ARN (ARNi). El ARNi es un desarrollo relativamente reciente para reducir la expresión de los genes. Siguen informes de silenciamiento de genes en plantas y otros organismos modelo y se basa en la observación de *C. elegans* que añadiendo ARN bicatenario (ARNbc) a las células con frecuencia se interfiere con la función de los genes de una manera específica de la secuencia. En muchos casos, el nivel de reducción funcional no se puede controlar de manera adecuada, es incompleto, el nivel de especificidad no es completamente predecible y en algunos organismos el ARNi no actúa (por ejemplo en el *Candida albicans* de levadura).

40 Es obvio que la genómica funcional ha cambiado la manera en que se hace biología y aún el campo está todavía en mantillas en términos de detallar la complejidad que subyace a los sistemas biológicos, tal como la compleja red de la regulación genética, las interacciones de proteínas y las reacciones bioquímicas que hacen una célula. Claramente hay una necesidad de desarrollar tecnologías innovadoras, especialmente en el campo de la proteómica funcional, para acelerar descubrimientos y maximizar el potencial ofrecido por métodos complementarios en genómica funcional. Sería deseable poseer una tecnología flexible que pueda fijar como objetivo directamente la función biológica de una proteína extracelular o intracelular particular en vez de fijar como objetivo el ARNm que la traduce o manipula el gen que la codifica.

50 Se cree que la conversión de proteínas normalmente solubles en proteínas insolubles modificadas de manera conformacional es un proceso causativo en una variedad de enfermedades tales como por ejemplo la existencia de péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer y angiopatía amiloide cerebral, depósitos de alfa-sinucleína en cuerpos de Lewy de la enfermedad de Parkinson, priones en la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, superóxido dismutasa en esclerosis lateral amiotrófica y tau en ovillos neurofibrilares en demencia frontotemporal y enfermedad de Pick. Hasta ahora, la agregación de proteínas ha sido estudiada principalmente como un fenómeno causante de enfermedad, no deseado y es ampliamente aceptado que la agregación mediada por beta cruzada es el mecanismo de agregación² que se produce lo más frecuentemente y biológicamente relevante. La agregación beta cruzada es el término usado para indicar que la agregación es nucleada vía la formación de láminas beta intermoleculares a las que cada molécula en el agregado contribuye una hebra idéntica que comprende típicamente al menos tres aminoácidos contiguos. Ahora hay datos abundantes para demostrar que las hebras individuales interactúan para formar una lámina beta intermolecular y que esta estructura forma la cadena principal del agregado^{3,4}. Las regiones de autoasociación en proteínas diana se pueden determinar por programas informáticos, tales como TANGO⁶, que se desarrolló prediciendo la propensión a la agregación de péptidos y proteínas. Una forma específica de agregación, es decir la fibra amiloide altamente ordenada, ya se está explorando en la técnica para uso potencial en las ciencias⁵ materiales. Además, la patente internacional WO 03102187 (Scegen, Pty Ltd) desvela un método para mejorar la actividad de una molécula por fusión de dicha molécula con una secuencia de traslocación de membrana,

según lo cual la molécula quimérica resultante se autoensambla en un agregado de mayor peso molecular. La patente de EE.UU. 20050026165 (Areté Associates) desvela el uso de péptidos conformacionales, capaces de interactuar con la conformación de láminas beta de proteínas insolubles tales como priones, como una herramienta de diagnóstico para enfermedades por priones. La técnica anterior también describe mutaciones de proteínas antimórficas o negativas dominantes. La inhibición de la función de la proteína por tales mutaciones también se ha descrito para fines terapéuticos. La patente de EE.UU. 2003/0064384 sugiere bloqueo de la acción de la beta-catenina por mutantes dominantes negativos de esta proteína que se puede usar para el tratamiento del cáncer. La patente europea EP1325930 desvela antagonismo de la acción de la prolactina por mutantes N-terminales del receptor de prolactina, que se puede usar para tratamiento de tumores. Sellman et al., describen el tratamiento de patógenos por mutantes dominantes negativos, es decir del envenenamiento por toxina ántrax causado por *Bacillus anthracis*. Los cuatro mutantes inhibidores identificados son mutantes en 3 puntos y un mutante de delección (Sellman et al., *Science* 292: 695-697 (2.001)).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una tecnología para la agregación de proteínas controlada e inducible de proteínas diana específicas. La invención también proporciona moléculas designadas *de novo*, designadas en la presente memoria como moléculas de interferón, que comprenden al menos una región de agregación de la que dicha región de agregación procede de una proteína diana. En una realización preferida, la molécula de interferón comprende al menos una región de autoasociación que se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación. En el contacto entre una proteína diana elegida y una molécula de interferón diseñada específicamente, tiene lugar una coagregación específica entre la diana y el interferón que da como resultado una inhibición funcional o una regulación por disminución de la función biológica para dicha proteína diana. Esta supresión de la proteína está condicionada por la presencia de agregados, que son inducidos por la presencia de la molécula de interferón. Una ventaja adicional es que la intensidad de la interferencia de la proteína se puede controlar de manera experimental por variación del número de regiones de agregación en la molécula de interferón. La invención no sólo proporciona una herramienta eficaz para regular por disminución la función biológica de una proteína extra o intracelular específica sino que también tiene aplicaciones terapéuticas, agrícolas y de diagnóstico importantes.

Leyendas de la figura

Figura 1: Interferencia de proteínas en *E. coli* usando la expresión recombinante de 4 construcciones de interferón diferentes cuyas enzimas específicas diana están implicadas en la biosíntesis de aminoácidos. La parte B de cada molécula de interferón consiste en 3 secuencias de auto-asociación sintéticas, separadas por ligadores de 2 aminoácidos y una región de autoasociación específica procedente de la enzima. Las regiones de autoasociación (sintéticas y específicas) se acoplan a la proteína NusA que sirve como un resto para evitar la agregación (es decir parte A de la molécula de interferón) de las regiones de autoasociación.

Figura 2: Se transformaron células de *S. cerevisiae* con una copia de cepa natural endógena de *URA3* con el plásmido vacío, el plásmido con sólo la secuencia agregadora o el plásmido con la construcción de fusión de agregador-Ura3. Las células fueron cultivadas durante la noche en medio que contenía glucosa, se lavaron y después se pusieron en placas sobre medio que contenía o glucosa (izquierda) o galactosa (derecha) conteniendo medio. Se pusieron en placas 5 µl de diluciones de 10 veces ($OD_{600}=1$ como la concentración más alta).

Figura 3: Se transformaron células *C. albicans* con dos copias de cepa natural endógena de *TUP1* con el plásmido vacío y el plásmido con la construcción de fusión de interferón-Tup1. Las células fueron cultivadas durante la noche en medio que contenía glucosa, se lavaron y después se pusieron en placas 20 colonias en medio que contenía o glucosa (izquierda) o casaminoácido (derecha). El panel superior son aquéllos con un plásmido vacío, el panel inferior con la construcción de interferón ("+ agreg.-TUP1" significa construcción de interferón-TUP1). Las fotografías se tomaron después de 4 días de crecimiento.

Objetos y descripción detallada de la invención

En la presente invención se ha desarrollado un procedimiento para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína por el uso de moléculas de interferón que presentan una especificidad para una proteína diana. En el contacto con una proteína diana tiene lugar una co-agregación entre la molécula de interferón y la diana. La agregación retira la diana de su entorno soluble y da como resultado una supresión funcional de la proteína diana.

El objeto de la invención se define en las reivindicaciones. La invención proporciona un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína, en la que el método no se realiza en seres humanos o animales, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína.

En otra realización la invención proporciona un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que consiste en al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína.

5 La invención también proporciona un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína, en la que el método no se realiza en seres humanos o animales, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína en la que dicho dominio de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación.

10 La invención también proporciona un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína que comprende, en la que el método no se realiza en seres humanos o animales, poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que consiste en al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína en la que dicho dominio de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación.

15 La invención también proporciona un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína, en la que el método no se realiza en seres humanos o animales, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A es un péptido o un dominio proteico o una perla de agarosa que evita la agregación de la parte B y ii) la parte B que comprende al menos 1 región de autoasociación que consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína, con cuya función se tiene que regular por disminución, y en la que un ligador está presente opcionalmente entre las partes A y B.

20 La invención también proporciona un método para la regulación por disminución de la función de una proteína, en la que el método no se realiza en seres humanos o animales, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A es un péptido o un dominio proteico o una perla de agarosa que evita la agregación de la parte B a fin de que la parte B esté en contacto directo con el disolvente en el que dicha molécula y dicha proteína están presentes y ii) la parte B que comprende al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína con cuya función se tiene que regular por disminución, y en la que un ligador está presente opcionalmente entre las partes A y B.

25 En otra realización, la parte B de la molécula que no se encuentra en la naturaleza comprende al menos 2 regiones de autoasociación en la que al menos una de dichas regiones procede de dicha proteína con cuya función se tiene que interferir.

30 El término 'molécula que no se encuentra en la naturaleza' se refiere al hecho de que tal molécula de interferón está fabricada por el hombre. Por ejemplo, cuando una molécula de interferón es polipéptido (es decir tanto la parte A como la B son péptidos) tal polipéptido se diseña por aislamiento de la parte B de una proteína diana (es decir la región de autoasociación) y por acoplamiento de dicha parte B a una parte A que puede proceder (i) de otra proteína o (ii) de la misma proteína diana en cuyo caso dicha parte A no está presente inmediatamente adyacente a la parte B. En otras palabras más, la región de autoasociación procede de la diana fusionada a un resto (cuando el interferón es un polipéptido dicho resto es también un polipéptido) que evita que la agregación de la región de autoasociación sea diferente de una fusión que tenga lugar en la naturaleza entre la parte A y B por al menos un aminoácido natural. Típicamente, tal molécula de interferón no existirá como un polipéptido contiguo en una proteína codificada por un gen en un genoma no recombinante.

35 Debería estar claro que las moléculas de interferón se pueden diseñar de una manera modular, por introducción de repetición y cambiando el orden de las partes A y B. Una lista no limitante de las siguientes combinaciones es: un interferón con la estructura A-B -, un interferón con la estructura B-A -, un interferón con la estructura A-B-A -, un interferón con la estructura B-A-B -, un interferón con la estructura A'-B-A" y un interferón con la estructura B'-A-B" en las que un ligador (espaciador) está opcionalmente presente entre las partes A, A', A" y B, B', B". A, A' y A" son diferentes de restos similares (por ejemplo diferentes secuencias peptídicas). B, B' y B" son secuencias de autoasociación diferentes o similares (por ejemplo, B es una secuencia de autoasociación procedente de la proteína diana y B' es una secuencia de autoasociación sintética).

40 En otras palabras más, la invención proporciona un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína, en la que el método no se realiza en seres humanos o animales, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que comprende al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína, en la que dicha región de autoasociación está fusionada a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación a fin de que dicha región de autoasociación esté en contacto directo con el disolvente en el que dicha molécula y dicha proteína están presentes. A partir de lo anterior debería estar claro que dicho 'resto' es equivalente con el término parte A y parte B es equivalente con la formulación 'al menos una región de autoasociación'.

La formulación 'regulación por disminución de la función de una proteína' significa que se reduce la actividad biológica normal de una proteína (inhibida, regulada por disminución, reducida e interrumpida son palabras equivalentes en la presente memoria) o que la proteína se retira de su entorno biológico normal (por ejemplo, una proteína que es un residente normal del retículo endoplasmático no está presente por regulación por disminución de su función). Así, por aplicación del método de la invención la función de una proteína se interrumpe por una agregación de dicha proteína poniendo en contacto dicha proteína con la molécula no natural de la presente invención. Dicha molécula no natural se designa en la presente memoria como 'el interferón' o la 'molécula de interferón'. Agregación se refiere al hecho de que una proteína que normalmente es soluble se cambia a una proteína insoluble o una proteína agregada en su entorno biológico normal por contacto directo o unión con el interferón. La formulación 'regulación por disminución de la función de una proteína' también se puede intercambiar por la formulación 'suprimir la función de una proteína' o 'interferir de manera negativa con la función de una proteína'. La regulación por disminución de la función de una proteína también puede significar que una proteína no esté presente más en una forma soluble en la célula o que una proteína no esté presente más en una forma soluble en su entorno biológico normal (por ejemplo localización (sub)-celular o extra-celular). Además, también puede significar que la proteína agregada se degrada por los mecanismos de eliminación naturales de la célula y ya no es detectable en forma soluble o insoluble. Además, también puede significar que una proteína receptora transmembrana no puede unir su ligando normal más por agregación inducida por interferón de dicha proteína transmembrana. Así la regulación por disminución de la función de una proteína también puede significar que una proteína que es un residente normal de, por ejemplo, las mitocondrias no está presente allí más por el método de interferencia de proteínas. En una realización particular, la 'regulación por disminución de la función de una proteína' o 'la interferencia negativa con la función de una proteína' o 'suprimir la función de una proteína' es al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o incluso un 100% pérdida de función cuando se compara con la función normal (100%) de la proteína.

La función de una proteína o la ausencia de presencia de una proteína en su entorno biológico normal (localización) se puede determinar convenientemente por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, dependiendo de la proteína diana de interés, la función se puede determinar por medición de la actividad enzimática reducida. La presencia reducida de una proteína en su localización biológica normal se puede medir por ejemplo por la ausencia de formación de un complejo, la ausencia de la existencia de una proteína diana en un compartimento subcelular, la presencia de la proteína diana en forma soluble, la presencia de la proteína diana en una forma agregada (insoluble es un término equivalente en la presente memoria). Alternativamente, el efecto de la regulación por disminución de una proteína diana se puede medir en un ensayo celular (por ejemplo, pérdida o ganancia de crecimiento, pérdida o ganancia de invasión, pérdida o ganancia de actividad proteolítica).

En una realización particular, tal actividad biológica normal (o función normal o localización normal) de una proteína puede ser interferida de manera intracelular o de manera extracelular. 'De manera intracelular' se refiere a la localización de una proteína en el interior de la célula de un organismo o huésped (por ejemplo, el citoplasma, las mitocondrias, el lisosoma, la vacuola, el núcleo, el cloroplasto, el retículo endoplasmático (RE), la membrana celular, la membrana mitocondrial, la membrana del cloroplasto, ...). 'De manera extracelular' no sólo se refiere a la localización de una proteína en el medio extracelular de la célula sino también se refiere a proteínas que se ponen en contacto con el medio extracelular tal como proteínas ancladas a una membrana, una proteína transmembrana etc. Ejemplos no limitantes de proteínas extracelulares son proteínas segregadas (por ejemplo, proteasas, anticuerpos y citocinas presentes en la sangre o el plasma) o proteínas presentes en la matriz extracelular (por ejemplo, metaloproteínas de la matriz y proteínas transmembrana (por ejemplo un receptor del factor de crecimiento)).

Las células o los huéspedes que se pueden fijar como objetivo con el método de la invención comprenden células procariontas y eucariontas. Ejemplos no limitantes son virus, bacterias, levaduras, hongos, protozoos, plantas y mamíferos incluyendo seres humanos.

Debería estar claro que el método de regulación por disminución de la función biológica de una proteína se puede usar para interferir con la función biológica con 1, 2, 3, 4, 5 o incluso más proteínas simultáneamente. En particular puesto que la parte B comprende al menos una región de autoasociación, la parte B puede comprender por ejemplo diferentes regiones de autoasociación cada una específica para una proteína diferente. El interferón usado para interferencia con la función biológica de al menos una proteína diana no está presente de manera natural en la naturaleza y se puede fabricar por síntesis química o por expresión de proteína recombinante o por una combinación de lo último.

Así una molécula de interferón comprende al menos una región de autoasociación (así la parte B comprende al menos una región de autoasociación). Una 'región de autoasociación' se define en la presente memoria como una secuencia contigua de aminoácidos que presenta una alta tendencia a formar un conjunto molecular estrecho con secuencias idénticas o muy estrechamente relacionadas. La formulación 'presenta una alta tendencia a formar un conjunto molecular estrecho' también se puede interpretar como 'presenta una alta afinidad'. Afinidad se traduce

normalmente en valores de disociación (valores Kd). Los valores de Kd entre interferón y proteínas diana se encuentran típicamente entre los intervalos micromolar y nanomolar, pero pueden ser sub-nanomolar o supra-micromolar. Ejemplos de regiones de autoasociación son regiones de láminas beta intermoleculares, elementos alfa-helicoidales, bucles de horquilla, secuencias transmembrana y secuencias de señal. En una realización particular al menos una región de autoasociación está presente en la parte B. En otra realización particular al menos dos regiones de autoasociación están presentes en la parte B. En otra realización particular 3, 4, 5, 6 o más regiones de autoasociación están presentes en la parte B. Dichas regiones de autoasociación se pueden interconectar por una región ligadora (por ejemplo un espaciador de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 aminoácidos). Una región de autoasociación (o al menos una) presente en la parte B procede de una proteína diana. En una realización particular 2, 3, 4, 5, 6 o más regiones de autoasociación en la parte B proceden de una proteína diana. En otra realización particular 2, 3, 4, 5, 6 o más regiones de autoasociación en la parte B proceden de más de 1 proteína diana. En otra realización particular al menos dos regiones de autoasociación presentes en la parte B proceden de la misma proteína diana. La proteína diana se define en la presente memoria como la proteína con la cual se desea interferir con su función. Así, para fabricar la parte B específica para al menos una proteína al menos una región de autoasociación en la parte B debería 'proceder de' la proteína diana o al menos una región de autoasociación debería estar presente en dicha proteína diana. 'Procedente de' significa que al menos una región de autoasociación contigua debería ser idéntica u homóloga en secuencia de aminoácidos a una región contigua de dicha proteína diana. En una realización preferida, al menos dicha región de autoasociación es al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% idéntica a la región de autoasociación presente en dicha región de la proteína diana.

Se prefiere que la longitud de una región de autoasociación consista en al menos 3 aminoácidos contiguos. En una realización preferida, dicha región consiste en aproximadamente 3 a aproximadamente 30 aminoácidos. En otra realización preferida, dicha región consiste en aproximadamente 3 a aproximadamente 25 aminoácidos. En una realización preferida en particular dicha región consiste en aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos.

También se pueden determinar regiones de autoasociación presentes en la parte B de la molécula de interferón y aislar de proteínas distintas de la proteína diana y dichas regiones de autoasociación se acoplan con al menos una región de autoasociación procedente de la proteína diana, opcionalmente con un espaciador (o ligador) entre dichas regiones de autoasociación. Por ejemplo, regiones de autoasociación que se pueden usar pueden proceder de regiones de autoasociación de proteínas que no se dan normalmente en el huésped en que se realiza la regulación por disminución de la función biológica de una proteína diana (así se pueden tomar algunas regiones de autoasociación en la parte B de un organismo no relacionado). La naturaleza de las regiones de autoasociación determina el nivel de inhibición (es decir, la intensidad de inhibición) de una proteína diana por agregación inducida. Se puede usar más de una región de autoasociación a partir de una proteína diana en una molécula de interferón pero se pueden usar también regiones de autoasociación sintéticas o regiones de autoasociación procedentes de una proteína diana diferente junto con una o más regiones de autoasociación de una proteína diana.

En una realización particular, tales regiones de autoasociación consisten en una secuencia sintética que no procede de proteínas existentes y por lo tanto no se produce en la naturaleza. Ejemplos de tales regiones de autoasociación sintéticas se describen en López de la Paz M. et al (2.002) PNAS 99, 25, pág. 16.053, tabla 1.

Si al menos una región de autoasociación (es decir, la parte B de la molécula de interferón) tiene un carácter hidrófobo (debido a sus propiedades de inducción de la agregación) se fusiona preferiblemente (o se liga o se acopla que son términos equivalentes) a un resto (es decir, la parte A de la molécula de interferón) que evita la agregación de dicha región de autoasociación y expone dicha región de autoasociación en contacto directo con el disolvente en que está presente el interferón. Como tal, en ciertas realizaciones, la parte A tiene una función de solubilización para mantener la parte B en disolución. En tales realizaciones dicha parte A es por ejemplo un péptido, un dominio proteico, una proteína (preferiblemente diferente de la proteína diana, véase el ejemplo 2), una estructura de glucosilación, un grupo químico (hidrófilo) o una ciclodextrina o derivado de la misma. En algunas otras realizaciones dicha parte A es una perla de agarosa, una perla de látex, una perla de celulosa, una perla magnética, una perla de sílice, una perla de poliacrilamida, una microesfera, una perla de vidrio o cualquier soporte sólido (por ejemplo, poliestireno, plástico, membrana de nitrocelulosa, vidrio).

En las moléculas de interferón la parte B y la parte A pueden estar ligadas opcionalmente (o acopladas) por medio de una región ligadora (un espaciador es una palabra equivalente). Dicha región ligadora puede ser, por ejemplo, un ligador no natural fabricado por síntesis química (por ejemplo, un ligador flexible tal como una cadena de alcano sustituido con hidroxilo, dextrano, polietilenglicol o el ligador también puede consistir en homólogos de aminoácido) o dicho ligador puede existir de aminoácidos naturales tales como una poli(treonina) o poli(serina). Preferentemente cuando el ligador comprende aminoácidos, la longitud de dicha región ligadora está entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 aminoácidos, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 aminoácidos. Con frecuencia se puede elegir un ligador flexible pero se prevé que un ligador rígido también funcione. Las secuencias de ligador flexible se pueden tomar de la naturaleza, la mayoría de tales regiones conectan dominios en proteínas que se encuentran en la naturaleza, tal como el ligador entre los dominios SH2 y SH3 src tirosina cinasa o el ligador entre los dominios BRCT de BRCA1.

El término 'poner en contacto' se refiere al procedimiento en que interactúan el interferón y la proteína diana. En una forma se añade el interferón (por ejemplo el interferón está presente en una concentración particular en una disolución) a una muestra que comprende la proteína diana. En otra forma la molécula de interferón se inyecta en un organismo que comprende la proteína diana. La puesta en contacto por ejemplo también se puede realizar por el procedimiento de transformación de una célula que comprende la proteína diana, por ejemplo una célula aislada, por ejemplo en cultivo celular, un microorganismo unicelular o una célula o una pluralidad de células dentro de un organismo multicelular. La transformación implica que la molécula de interferón se introduce en un huésped (por ejemplo una célula) por métodos de transfección o transformación conocidos comúnmente (por ejemplo, por técnicas de transferencia de genes incluyendo fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección, métodos víricos, el uso de liposomas catiónicos (véase por ejemplo Feigner, P. L. et al. (1.987), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 7.413), formulaciones de lípidos catiónicos comercialmente disponibles, por ejemplo, Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin2000 (Life Technologies), bombardeo de partículas, etc.). La molécula de interferón se puede codificar mediante un vector recombinante (por ejemplo, un plásmido, cósmido, vector vírico) y se puede sintetizar en el interior de un huésped. En una realización alternativa, la molécula de interferón se puede introducir en una célula por suministro mediado por portador, por ejemplo por portadores liposomales o nano-partículas o por inyección. En otra realización alternativa más, la molécula de interferón puede entrar en una célula por una secuencia que media la penetración celular (o traslocación celular). En el último caso, la molécula de interferón se modifica además por la unión recombinante o sintética de una secuencia de penetración celular. Así, la molécula de interferón (por ejemplo como un polipéptido) se puede fusionar además o acoplar de manera química a una secuencia que facilita la transducción de las proteínas de fusión o acopladas de manera química en células procariotas o eucariotas. Las secuencias que facilitan la transducción de proteínas son conocidas para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a Dominios de Transducción de Proteínas. Preferiblemente, dicha secuencia se selecciona del grupo que comprende la proteína TAT del VIH, una secuencia de poliarginina, penetratina y pep-1. Otros péptidos más permeables a las células usados comúnmente (péptidos tanto naturales como artificiales) se desvelan en Joliot A. y Prochiantz A. (2.004) *Nature Cell Biol*: 6 (3) 189-193.

En una realización particular, el interferón consiste esencialmente en aminoácidos. En algunas realizaciones, las secuencias de las partes A y B de la molécula de interferón proceden de la misma proteína diana. En otras realizaciones, el interferón es una molécula quimérica que significa que las secuencias de las partes A y B proceden de diferentes proteínas, por ejemplo la parte A procede de una proteína y al menos una región de agregación de la parte B procede de la proteína diana. Un "Polipéptido" se refiere a un polímero en que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí por enlaces amida, referido alternativamente como un péptido. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, se puede usar o el isómero óptico L o el isómero óptico D. Adicionalmente, aminoácidos no naturales, por ejemplo, beta-alanina, fenilglicina y homoarginina también están incluidos. También se pueden usar en la presente invención aminoácidos comúnmente encontrados que no están codificados génicamente. Todos o parte de los aminoácidos usados en los interferones pueden ser el isómero D o L. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Nos referimos específicamente y se incorpora en la presente memoria la revisión del desarrollo y uso de peptidomiméticos como antagonistas para interacciones proteína-proteína de Sillerud LO y Larson RS (2.005) *Curr Protein Pept Sci*. 6 (2): 151-69. Además, se pueden añadir D-aminoácidos a la secuencia peptídica para estabilizar las características de las vueltas (especialmente en el caso de la glicina). En otra solución se pueden emplear imitaciones de vueltas alfa, beta, gamma o delta (tales como di-péptidos alfa, beta, gamma o delta se pueden emplear para imitar motivos estructurales y características de las vueltas en un péptido y simultáneamente proporcionar estabilidad a partir de la proteólisis y mejorar otras propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad conformacional y la solubilidad.

Aislamiento de una región de autoasociación a partir de una proteína diana:

Las secuencias de autoasociación son con frecuencia hidrófobas pero este no es siempre el caso. Por ejemplo, las regiones de autoasociación de los priones de levaduras son más bien polares. De hecho, la agregación beta cruzada de una región de aminoácidos procedente de un polipéptido o proteína se puede iniciar cuando (1) tiene una alta hidrofobicidad, (2) tiene una buena propensión de lámina β , (3) tiene una baja carga neta y (4) está expuesta al disolvente. Así, las regiones de proteínas de autoasociación ('segmento' es un término equivalente para 'región') están alojadas lo más frecuentemente en estado plegado y no están expuestas al disolvente. Lo último se confirma por el hallazgo experimental de que en muchas proteínas globulares, la agregación tiene lugar durante el repliegamiento o en condiciones en que los estados desnaturalizados o parcialmente plegados están poblados de manera significativa, es decir, a alta concentración o como resultado de condiciones de desestabilización o mutaciones.

Basándose en estos hallazgos se desarrollaron algoritmos informáticos que pueden predecir regiones de autoasociación ("tramos o segmentos de agregación β " es una formulación equivalente) en proteínas. Uno de tales algoritmos, TANGO, se basa en un algoritmo de la mecánica estadística que considera los tres parámetros físico-químicos descritos anteriormente pero también considera competición entre diferentes conformaciones estructurales: vuelta-beta, alfa-hélice, agregados de lámina beta y el estado plegado (Fernandez-Escamilla, AM et al (2.004) *Nat. Biotechnol*. 22, 1.302-1.306, especialmente la sección Métodos en las páginas 1.305 y 1.306 está en la presente

memoria incorporada específicamente por referencia y también las Notas Suplementarias 1 y 2 del mismo artículo para más detalles sobre los métodos y las series de datos usadas para la calibración y el ensayo del algoritmo TANGO). Así, las regiones de autoasociación presentes en proteínas diana se pueden obtener por algoritmos informáticos tales como TANGO. Las regiones de autoasociación con frecuencia están alojadas en el interior del núcleo de las proteínas¹⁰ diana, protegiendo eficazmente al péptido de la asociación intermolecular por una barrera de energía correspondiente a la estabilidad de las proteínas¹¹ diana. En su entorno normal (por ejemplo, citoplasma, matriz extracelular) la proteína diana tiene ayuda de las chaperonas moleculares que ayudan a que la proteína mantenga su forma¹² monomérica, funcional. El modelo usado para el algoritmo⁶ TANGO se diseña para predecir la beta-agregación en péptidos y proteínas y consiste en un espacio de fases que incluye el arrollamiento aleatorio y las conformaciones naturales así como otros estados conformacionales principales, es decir vuelta-beta, alfa-hélice y agregado-beta. Cada segmento de un péptido puede poblar cada uno de estos estados según una distribución de Boltzmann. Por lo tanto, para predecir las regiones de autoasociación de un péptido, TANGO simplemente calcula la función de partición del espacio de la fase. Para estimar la tendencia a la agregación de una secuencia de aminoácidos particular, se hacen los siguientes supuestos: (i) en un agregado de lámina beta ordenado, la principal estructura secundaria es la hebra beta. (ii) las regiones implicadas en el procedimiento de agregación están completamente alojadas, pagando así los costes y ganancias totales de solvatación, entropía total y optimización de su potencial de enlace de H (esto es, el número de enlaces de H hechos en el agregado está relacionado con el número de grupos donadores que son compensados por los aceptores. Un exceso de donadores o aceptores permanece insatisfecho). (iii) las cargas de manera complementaria en la ventana seleccionada establecen interacciones electrostáticas favorables y la carga neta total del péptido en el interior pero también fuera de la ventana desfavorece la agregación. Se puede acceder a TANGO en la Web <http://tango.embl.de/>. El algoritmo zyggregator es otro ejemplo (Pawar AP *et al* (2.005) *J. Mol. Biol.* 350, 379-392). Estos algoritmos identifican las secuencias con tendencia a la agregación por comparación de la puntuación de tendencia a la agregación de una secuencia de aminoácidos determinada con una tendencia media calculada a partir de una serie de secuencias de longitud similar.

En la presente invención, se estima que una región de autoasociación identificada dentro de una proteína diana con una puntuación de TANGO de 5% corresponde a un riesgo de agregación *in vitro* de 95%⁶. Se ha calculado que el 85% de las proteínas de proteoma humano que no están relacionadas con la enfermedad tienen al menos una región con una puntuación TANGO por encima del umbral determinado de manera experimental del 5%. Esto muestra que aunque más del 85% de las proteínas humanas contiene al menos una sola región de autoasociación se previene esa agregación debido a la estabilidad normal de la proteína y la ayuda de la maquinaria de la chaperona. La presente invención aísla estas regiones de autoasociación de proteínas diana para la preparación de moléculas de interferón que se usan para la inducción específica de la agregación de las proteínas. La parte B de las moléculas de interferón comprende al menos 1 región de agregación y al menos una región de agregación procede de una proteína diana. Es posible controlar la intensidad de la interferencia de las proteínas (la intensidad de la interferencia de las proteínas es por ejemplo el % de pérdida de función biológica de una proteína diana cuando dicha proteína o célula que comprende dicha proteína se pone en contacto con una molécula específica de interferón) por la incorporación de más de una región de agregación de una proteína diana en la parte B de la molécula de interferón. Por supuesto, las regiones de agregación proceden de una proteína diana con una puntuación TANGO baja (típicamente entre 5% y aproximadamente 20%) se pueden repetir en la parte B del interferón para 2, 3, 4 o más regiones de agregación. Como realización alternativa 1, 2 ó 3 ó 4 o más diferentes regiones de agregación con una puntuación TANGO baja procedentes de la misma proteína se pueden incorporar en la parte B del interferón. Como otra realización alternativa 1, 2, 3, 4 o más regiones de agregación sintéticas (así no procedentes de la proteína diana) se pueden combinar con 1, 2, 3, 4 o más regiones de agregación procedentes de la proteína diana en la parte B para mejorar la regulación por disminución de una proteína diana con una puntuación TANGO baja.

La invención proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza capaz de agregar una proteína diana. En una realización particular, dicha molécula no natural es proteinacea por naturaleza. Proteinacea significa que la molécula comprende L-aminoácidos o D-aminoácidos o una mezcla de L- y D-aminoácidos o una combinación de aminoácidos naturales y peptidomiméticos.

La invención proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación aislada de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación.

La invención también proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación aislada de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación a fin de que dicha región de autoasociación esté en contacto directo con el disolvente en el que está presente.

La invención también proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza que consiste en al menos una región de autoasociación aislada de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación.

La invención también proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza que consiste en al menos una región de autoasociación aislada de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación a fin de que dicha región de autoasociación esté en contacto directo con el disolvente en el que está presente.

En una realización particular, tal resto es por ejemplo un péptido, una perla de agarosa, un dominio proteico o una proteína. En otra realización particular, dicha molécula que no se encuentra en la naturaleza comprende al menos dos regiones de autoasociación de las cuales al menos una región de autoasociación procede de una proteína diana.

En otras palabras, la invención proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza, que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico, proteína o perla de agarosa que evita la agregación de la parte B y ii) parte B que comprende al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína con cuya función se tiene que interferir y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B.

En otras palabras más, la invención proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico o perla de agarosa que evita la agregación de la parte B y ii) parte B que comprende al menos 1 región de autoasociación que consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que al menos una región de autoasociación se aísla de una proteína con cuya función se tiene que interferir y en la que dicha región se aísla de un dominio de dicha proteína que es capaz de ser soluble en agua y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B y en la que la parte B está en contacto directo con el entorno en el que dicha molécula y dicha proteína están presentes.

En otras palabras más, la invención proporciona una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico o perla de agarosa que evita la agregación de la parte B y ii) parte B que consiste en al menos 1 región de autoasociación que consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que al menos dicha región de autoasociación se aísla de una proteína con cuya función se tiene que interferir y en la que dicha región procede de un dominio de dicha proteína que es capaz de ser soluble en agua y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B, y en la que la parte B está en contacto directo con el entorno en el que dicha molécula y dicha proteína están presentes.

La formulación 'aislada (o forma derivada) de un dominio de dicha proteína que es capaz de que sea soluble en agua' significa que una región de autoasociación es una secuencia de aminoácidos contiguos aislada de un dominio soluble de una proteína. Lo último también significa que las regiones de autoasociación procedentes de regiones transmembrana o regiones de autoasociación procedentes de secuencias de señales están excluidas de manera específica en el alcance de las reivindicaciones de estos productos moleculares de interferón en tales realizaciones.

En la presente invención al menos una región de autoasociación de la molécula de interferón (es decir, parte B de la molécula de interferón), está 'en contacto directo' con el entorno (por ejemplo, disolvente, citosol) en que dicha molécula de interferón está presente. La importancia de esto se aclara además. En proteínas globulares las secuencias de autoasociación (también designadas como 'regiones de nucleación de agregación') están alojadas generalmente en el núcleo hidrófobo de la proteína globular y como tales se mantienen protegidas del disolvente por una red densa de interacciones cooperativas que estabilizan el estado natural. Por lo tanto, en circunstancias normales no hay 'contacto directo' entre dicha región de autoasociación y el entorno (por ejemplo, el disolvente). Sólo cuando la proteína no está plegada, por ejemplo cuando se sintetiza en el ribosoma o se desestabiliza por mutación, cambio de temperatura, pH o pérdida de una chaperona específica, favoreciendo de ese modo el estado no plegado, se expondrán sus regiones de autoasociación al entorno. Las regiones de autoasociación normalmente están alojadas en el interior de las proteínas (para evitar la agregación) y en la molécula no natural de interferón dichas regiones de autoasociación han sido aisladas y expuestas al entorno por unión de dichas regiones a un resto que evita la agregación (es decir, parte A de la molécula de interferón). En otras palabras más, la molécula no natural de interferón no se pliega en una estructura globular y, por lo tanto, al menos una región de autoasociación (es decir, parte B) en la molécula no natural de interferón está en contacto directo con el disolvente en que está presente dicha molécula de interferón. Por lo tanto, 'en contacto directo' se refiere a lo contrario de 'que estén alojadas y mantenidas protegidas de'.

En una realización específica, las moléculas de interferón que comprenden al menos una región de autoasociación procedente de un dominio proteico soluble son polipéptidos.

En otra realización específica, la invención proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica dichas moléculas de interferón.

En otra realización específica, las moléculas de interferón de la invención se usan como un medicamento.

Aplicaciones terapéuticas de las moléculas de interferón

5 Las proteínas son responsables de actividades biológicas que varían desde numerosas reacciones enzimáticas, sobretransducción de señales para proporcionar estructura. Los cambios en estructura, abundancia o actividad proteica están en la causa de la raíz de muchas enfermedades. Muchos fármacos actúan vía interferencia específica con una o un número limitado de proteínas. La presente invención proporciona un método para desarrollar una nueva clase de compuestos capaces de interferir de manera específica con una proteína diana de elección. Estos nuevos compuestos se designan como interferones.

10 Así, en otra realización más, la invención proporciona el uso como un medicamento de una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación procedente de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación.

15 En otra realización más, la invención proporciona el uso como un medicamento de una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación procedente de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación a fin de que dicha región de autoasociación esté en contacto directo con el disolvente en el que dicha molécula está presente.

20 En otras palabras más, la invención proporciona el uso como un medicamento de molécula que no se encuentra en la naturaleza de interferón, que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende una región, tal como un péptido o dominio proteico que evita la agregación de la parte B y ii) la parte B comprende al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región comprende al menos 3 aminoácidos contiguos procedentes de la proteína diana y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B.

25 En otras palabras más, la invención proporciona el uso como un medicamento de molécula que no se encuentra en la naturaleza de interferón, que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende una región, tal como un péptido o dominio proteico que evita la agregación de la parte B y ii) la parte B comprende al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región comprende al menos 3 aminoácidos contiguos procedentes de la proteína diana y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B y en la que la parte B está en contacto directo con el disolvente en el que está presente dicha molécula de interferón.

30 Dichas moléculas de interferón se pueden usar para tratar enfermedades y/o en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades, tal como cáncer, asociadas con la expresión aberrante de al menos una proteína diana; tal como una proteína oncogénica. El término 'expresión aberrante' se refiere a por ejemplo la (sobre)expresión de una proteína oncogénica en el caso de cáncer, también incluye la expresión de una proteína dominante negativa, la localización no deseada de una proteína particular o variante de empalme de una proteína particular, la expresión no deseada de una variante de empalme particular de una proteína particular, la mayor actividad de una proteína mutante o la mayor actividad de una proteína particular.

35 En una realización particular la "expresión aberrante" se refiere a la presencia no deseada de una proteína modificada de manera post-traducciona l o a la presencia no deseada de una proteína no modificada de manera post-traducciona l. Las modificaciones post-traduccionales modifican las propiedades físico-químicas de los aminoácidos modificados y como tales tienen el potencial de modificar la tendencia a la agregación de un segmento de polipéptido determinado que se puede explotar para fijar como objetivo de manera específica la forma que tiene la tendencia de agregación más fuerte. Así, si una modificación post-traducciona l disminuye de manera significativa la tendencia a la agregación de la región de autoasociación, entonces la interferencia será la más eficaz con la proteína no modificada. Por contraste, en caso de modificaciones post-traduccionales que aumenten la tendencia a la agregación de la región de autoasociación, entonces la interferencia será la más eficaz con la proteína modificada. Basándose en la hidrofobicidad sólo, se asume que las modificaciones tales como fosforilación y glucosilación disminuirán la tendencia a la agregación, mientras la unión lipídica aumentará la tendencia a la agregación.

40 La proteína diana a que se dirige la molécula de interferón de la invención se puede asociar con un estado patológico. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína asociada a patógenos, por ejemplo una proteína vírica, una proteína asociada a tumores o una proteína asociada a una enfermedad autoinmunitaria. En un aspecto, la invención caracteriza un método para tratar a un individuo con riesgo de o aquejado de proliferación celular no deseada, por ejemplo proliferación de células malignas o no malignas. El método incluye: proporcionar una molécula de interferón, por ejemplo un interferón que tiene una estructura como se describe en la presente memoria, en el que dicha molécula de interferón es capaz de interferir con (inhibir) la función y/o la presencia de una proteína que fomenta la proliferación celular no deseada y administrar dicho interferón a un individuo, preferiblemente un individuo humano, tratando al individuo de ese modo.

65 En una realización preferida, la proteína es un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento, una cinasa

(por ejemplo, una proteína tirosina, serina o treonina cinasa), una proteína adaptadora, una proteína de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G o un factor de transcripción. En una realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función biológica de la proteína PDGF-beta y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o que está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión PDGF-beta no deseada, por ejemplo, tumores malignos testiculares y de pulmón. En otra realización preferida, el interferón inhibe (suprime) la función y/o la presencia de la proteína Erb-B y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión Erb-B no deseada, por ejemplo, cáncer de mama. En otra realización preferida, el interferón inhibe la función (o "interfiere con la función" que es equivalente) de (o interfiere con la presencia de) la proteína Src y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión Src no deseada, por ejemplo tumores malignos de colon. En otra realización preferida, el interferón inhibe la función y/o la presencia de la proteína CRK y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión de CRK no deseada, por ejemplo tumores malignos de colon y pulmón. En otra realización preferida, el interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína GRB2 y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de GRB2, por ejemplo carcinoma escamoso. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia del gen RAS y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de RAS por ejemplo tumores malignos pancreáticos, de colon y de pulmón y leucemia crónica. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína MEKK y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de MEKK, por ejemplo carcinoma escamoso, melanoma o leucemia. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína JNK y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de JNK, por ejemplo tumores malignos pancreáticos o de mama. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína RAF y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de RAP, por ejemplo cáncer de pulmón o leucemia. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína Erkl/2 y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de Erkl/2, por ejemplo cáncer de pulmón. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína PCNA (p21) y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de PCNA, por ejemplo cáncer de pulmón. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína MYB y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de MYB, por ejemplo, cáncer de colon o leucemia mielógena crónica. En una realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína c-MYC y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de c-MYC, por ejemplo, linfoma de Burkitt o neuroblastoma. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína JUN y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de JUN, por ejemplo, tumores malignos de ovario, próstata o mama. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína FOS y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado, por expresión no deseada de FOS, por ejemplo tumores malignos de piel o próstata. En otra realización preferida, la molécula de interferón inhibe la función y/o la presencia de la proteína BCL-2 y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de BCL-2, por ejemplo, tumores malignos de pulmón o próstata o linfoma no de Hodgkin. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína Ciclina D y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de Ciclina D, por ejemplo tumores malignos de esófago y de colon. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína VEGF y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de VEGF, por ejemplo, tumores malignos de esófago, de colon o angiogénesis patológica. En una realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína EGFR y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de EGFR, por ejemplo cáncer de mama. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína Ciclina A y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de Ciclina A, por ejemplo, tumores malignos de pulmón y cervical. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína Ciclina E y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de Ciclina E, por ejemplo tumores malignos de pulmón y mama. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína WNT-1 y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de WNT-1, por ejemplo, carcinoma basocelular. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína beta-catenina y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de beta-catenina, por ejemplo, adenocarcinoma o carcinoma hepatocelular. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína c-MET y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado

por expresión no deseada de c-MET, por ejemplo carcinoma hepatocelular. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína cinasa C (PKC) y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de PKC, por ejemplo, cáncer de mama. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína NFKappa-B y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de NFKappa-B, por ejemplo, cáncer de mama.

En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína STAT3 y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de STAT3, por ejemplo cáncer de próstata. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína survivina y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de survivina, por ejemplo tumores malignos cervicales o pancreáticos. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína Her2/Neu y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de Her2/Neu, por ejemplo cáncer de mama. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína topoisomerasa I y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de topoisomerasa I, por ejemplo tumores malignos de ovario y colon. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la alfa proteína topoisomerasa II y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por expresión no deseada de topoisomerasa II por ejemplo, tumores malignos de mama y colon.

En otro aspecto, la invención se puede usar para tratar a un individuo, por ejemplo un ser humano, con riesgo de o aquejado con una enfermedad o un trastorno que se puede beneficiar por inhibición de angiogénesis, por ejemplo cáncer. El método incluye: proporcionar una molécula de interferón por ejemplo, una molécula de interferón que tiene una estructura descrita en la presente memoria, molécula de interferón que puede inhibir (o interferir con la función) una proteína que media la angiogénesis y administrar la molécula de interferón a un individuo, tratando al individuo de ese modo. En una realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína alfa v-integrina, y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por alfa v-integrina no deseada, por ejemplo tumores cerebrales o tumores de origen epitelial. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína receptora Flt-1 y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por receptores Flt-1 no deseados por ejemplo cáncer y artritis reumatoide. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función y/o la presencia de la proteína tubulina y así se puede usar para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de un trastorno caracterizado por tubulina no deseada, por ejemplo, cáncer y neovascularización retiniana.

En otro aspecto, la invención se puede usar para tratar a un individuo infectado con un virus o con riesgo de o aquejado con un trastorno o una enfermedad asociada a una infección vírica. El método incluye: proporcionar una molécula de interferón, por ejemplo una molécula de interferón que tiene una estructura descrita en la presente memoria, molécula de interferón que es homóloga a y puede silenciar, una proteína vírica o una proteína celular que media la función vírica, por ejemplo entrada o crecimiento y administrar dicha molécula de interferón a un individuo, preferiblemente un individuo humano, tratando al individuo de ese modo. Como tal la invención proporciona métodos para usar interferones para la fabricación de un medicamento para tratar pacientes infectados por virus incluyendo el Virus del Papiloma Humano, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis A (VHA), Virus de la Hepatitis C (VHC), Virus Sincitial Respiratorio (VSR), Virus del Herpes Simple (HSV), Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), un rinovirus, Virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del sarampión (VS) o poliovirus.

En otro aspecto, la invención se puede usar para tratar a un individuo infectado con un patógeno, por ejemplo un patógeno bacteriano, amibico, parasitario o fúngico. El método incluye: proporcionar una molécula de interferón, por ejemplo una molécula de interferón que tiene una estructura descrita en la presente memoria, en la que dicha molécula de interferón es capaz de interferir con la función de una proteína patógena procedente de dicho patógeno y administrar dicha molécula de interferón a un individuo, preferiblemente un individuo humano, tratando al individuo de ese modo. La proteína diana del patógeno puede ser una implicada en el crecimiento, síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas, transcripción, metabolismo energético (por ejemplo el ciclo de Krebs) o producción de toxinas. Así, la presente invención proporciona un método para tratar a pacientes infectados por ejemplo por Plasmodium falciparum, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Chlamydia pneumoniae o Mycoplasma pneumoniae.

En otro aspecto, la invención se puede usar para tratar a un individuo, por ejemplo un ser humano, con riesgo de o aquejado con una enfermedad o un trastorno caracterizado por una respuesta inmunitaria no deseada, por ejemplo una enfermedad o un trastorno inflamatorio o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario. El método incluye: proporcionar una molécula de interferón, por ejemplo, una molécula de interferón con una estructura descrita en la presente memoria, molécula de interferón que es capaz de inhibir (regular por disminución) la función y/o la

presencia de una proteína que media una respuesta inmunitaria no deseada y administrar dicha molécula de interferón a un individuo, tratando al individuo de ese modo. En una realización preferida, la enfermedad o el trastorno es una isquemia o lesión por revascularización, por ejemplo revascularización de la isquemia o lesión asociada a infarto agudo de miocardio, angina inestable, bypass cardiopulmonar, intervención quirúrgica (por ejemplo angioplastia, tal como angioplastia coronaria transluminal percutánea), una respuesta a un órgano o tejido trasplantado (por ejemplo tejido cardíaco o vascular trasplantado) o trombolisis. En otra realización preferida, la enfermedad o el trastorno es la reestenosis, por ejemplo reestenosis asociada a intervención quirúrgica (por ejemplo, angioplastia, tal como angioplastia coronaria transluminal percutánea). En otra realización preferida, la enfermedad o el trastorno es la Enfermedad del Intestino Inflamado por ejemplo Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa. En otra realización preferida, la enfermedad o el trastorno es inflamación asociada a una infección o lesión. En otra realización preferida, la enfermedad o el trastorno es asma, lupus, esclerosis múltiple, diabetes, por ejemplo diabetes de tipo II, artritis, por ejemplo reumatoide o psoriásica. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función de una integrina o co-ligando de la misma, por ejemplo VLA4, VCAM, ICAM. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función de una selectina o co-ligando de la misma, por ejemplo P-selectina, E-selectina (ELAM), L-selectina o P-selectina glucoproteína-(PSGL1). En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función de un componente del sistema complemento, por ejemplo, C3, C5, C3aR, C5aR, C3 convertasa, C5 convertasa. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función de una quimiocina o receptor de la misma, por ejemplo, TNF- α , IL-1 α , IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-8; TNFRI, TNFRII, IgE, SCYA11 o CCR3.

En otro aspecto, la invención se puede usar para tratar a un individuo, por ejemplo, un ser humano, con riesgo de o aquejado con dolor agudo o dolor crónico. El método incluye proporcionar una molécula de interferón, por ejemplo una molécula de interferón que tiene una estructura descrita en la presente memoria, molécula de interferón que es capaz de interferir con una proteína que media el proceso del dolor y administrar dicha molécula de interferón a un individuo, tratando al individuo de ese modo. En otra realización preferida, la molécula de interferón interfiere con la función de un componente de un canal de iones. En otra realización preferida en particular, la molécula de interferón interfiere con la función de un receptor neurotransmisor o ligando.

En otro aspecto, la invención se puede usar para tratar a un individuo, por ejemplo, un ser humano, con riesgo de o aquejado con una enfermedad o un trastorno neurológico. El método incluye proporcionar una molécula de interferón, por ejemplo una molécula de interferón con una estructura descrita en la presente memoria, molécula de interferón que es capaz de interferir con una proteína que media una enfermedad o un trastorno neurológico y administrar dicha molécula de interferón a un individuo, tratando al individuo de ese modo. En realizaciones particulares dichas enfermedades (o trastornos) que se pueden tratar incluyen Enfermedad de Alzheimer (en este caso la molécula de interferón interfiere con la función de una secretasa que conduce al procesamiento de APP por ejemplo una proteína implicada en el complejo de la gamma-secretasa (por ejemplo proteína presenilina 1 ó 2, una proteína Aph1, nicastrina, BACE1 o BACE2). El interferón inhibe el procesamiento de APP y evita la formación de beta amiloide insoluble. La misma estrategia se puede usar para evitar y/o tratar otras enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Huntington, una ataxia espinocerebelosa (por ejemplo SCA1, SCA2, SCA3 (enfermedad de Machado-Joseph), SCA7 o SCA8).

Así en un aspecto, la invención proporciona un método para la producción o fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de interferón y además mezclar dicha molécula de interferón con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la molécula de interferón es un polipéptido y se puede hacer de manera sintética o como una proteína recombinante. La proteína recombinante se puede fabricar usando sistemas de expresión recombinante que comprenden células bacterianas, células de levaduras, células animales, células de insecto, células de plantas o animales o plantas transgénicos. La proteína recombinante se puede purificar por cualquier procedimiento de purificación de proteínas convencional cerca de la homogeneidad y/o se mezcla con aditivos.

La administración de una composición farmacéutica que comprende una molécula de interferón puede ser por medio de administración oral, inhalada, transdérmica o parenteral (incluyendo intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad y subcutánea). El compuesto activo se puede administrar solo o se puede formular preferiblemente como una composición farmacéutica. Una dosis unitaria contendrá normalmente 0,01 a 500 mg, por ejemplo 0,01 a 50 mg o 0,01 a 10 mg o 0,05 a 2 mg de compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las dosis unitarias se administrarán normalmente una vez o más de una vez al día, por ejemplo 2, 3 ó 4 veces al día, más normalmente 1 a 3 veces al día, de manera que la dosis diaria total esté normalmente en el intervalo de 0,0001 a 10 mg/kg; así una dosis diaria total adecuada para un adulto de 70 kg es 0,01 a 700 mg, por ejemplo 0,01 a 100 mg o 0,01 a 10 mg o más normalmente 0,05 a 10 mg.

Se prefiere que el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administre en forma de una composición de dosis unitaria, tal como una composición de dosis unitaria oral, parenteral, transdérmica o inhalada. Tales composiciones se preparan por mezcla y se adaptan convenientemente para administración oral, inhalada, transdérmica o parenteral y como tal pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, tabletas, polvos reconstituibles, disoluciones o suspensiones inyectables e infundibles o

supositorios o aerosoles.

Los comprimidos y cápsulas para administración oral normalmente se presentan en una dosis unitaria y contienen excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes de formación de comprimidos, lubricantes, disgregantes, colorantes, aromatizantes y agentes humectantes. Los comprimidos pueden estar recubiertos según métodos conocidos en la técnica. Cargas adecuadas para uso incluyen celulosa, manitol, lactosa y otros agentes similares. Disgregantes adecuados incluyen almidón, polivinilpirrolidona y derivados de almidón tales como almidón glicolato de sodio. Lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio. Agentes humectantes farmacéuticamente aceptables, adecuados, incluyen laurilsulfato de sodio. Estas composiciones orales sólidas se pueden preparar por métodos convencionales de mezcla, carga, formación de comprimidos o similares. Se pueden usar operaciones de mezcla repetidas para distribuir el agente activo por todas estas composiciones empleando grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son, por supuesto, convencionales en la técnica.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, acuosos u oleosos o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, aceite de nuez de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como ésteres de glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y si se desea agentes aromatizantes o colorantes convencionales. Las formulaciones orales también incluyen formulaciones de liberación prolongada convencionales, tales como comprimidos o gránulos con un recubrimiento entérico.

Preferiblemente, las composiciones para inhalación se presentan para administración a las vías respiratorias como un rapé o un aerosol o disolución para un nebulizador o como un polvo microfino para insuflación, solo o junto con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso las partículas de compuesto activo tienen convenientemente diámetros menores que 50 micrómetros, preferiblemente menores que 10 micrómetros, por ejemplo entre 1 y 5 micrómetros, tal como entre 2 y 5 micrómetros. Alternativamente, se pueden usar nanopartículas recubiertas, con un tamaño de partícula entre 30 y 500 nm. Una dosis inhalada favorecida estará en el intervalo de 0,05 a 2 mg, por ejemplo 0,05 a 0,5 mg, 0,1 a 1 mg o 0,5 a 2 mg.

Para administración parenteral, las formas de dosis unitaria fluida se preparan conteniendo un compuesto de la presente invención y un vehículo estéril. El compuesto activo, dependiendo del vehículo y la concentración, puede estar o suspendido o disuelto. Normalmente se preparan disoluciones parenterales por disolución del compuesto en un vehículo y esterilizando con filtro antes de llenar un vial o ampolla adecuada y sellar. Ventajosamente, adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agentes amortiguadores también se disuelven en el vehículo. Para mejorar la estabilidad, la composición se puede congelar después de llenar el vial y retirar el agua a vacío. Se preparan suspensiones parenterales de sustancialmente la misma manera excepto que se suspende el compuesto en el vehículo en vez de disolverse y esterilizarse por exposición a óxido de etileno antes de suspensión en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un tensioactivo o agente humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del compuesto activo. En el caso de que sea apropiado, se pueden incluir pequeñas cantidades de broncodilatadores por ejemplo aminas simpaticomiméticas tales como isoprenalina, isoetarina, salbutamol, fenilefrina y efedrina; derivados de xantina tales como teofilina y aminofilina y corticosteroides tales como prednisolona y estimulantes adrenales tales como ACTH.

Como es práctica común, las composiciones normalmente estarán acompañadas por direcciones escritas o impresas para uso en el tratamiento médico relacionado.

En una realización preferida, la molécula de interferón comprende además un dominio de transducción de proteínas. Se ha demostrado que una serie de pequeños dominios proteicos, denominados dominios de transducción de proteínas (los PTD), cruzan membranas biológicas con eficacia e independencia de transportadores o receptores específicos y fomentan el suministro de péptidos y proteínas en las células. Por ejemplo, la proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) puede suministrar proteínas biológicamente activas in vivo. De manera similar, la tercera alfa-hélice de homeodominio Antennapedia y la proteína VP22 del virus de herpes simple activan el suministro de péptidos o proteínas unidos mediante enlaces covalentes a las células (revisado en Ford KG *et al* (2.001) *Gene Ther.* 8, 1-4). El suministro de proteínas basado en un portador de péptidos anfipáticos corto, Pep-1, es eficaz para el suministro de una variedad de péptidos y proteínas en varias líneas celulares en una forma completamente biológicamente activa, sin la necesidad de acoplamiento covalente químico previo (Morris MC *et al*, (2.001) *Nat. Biotechnol.* 19, 1.173-1.176). La capacidad de las proteínas quiméricas VP22 para extenderse desde la célula transducida primaria a células circundantes puede mejorar las propuestas de tratamiento génico (Zender L *et al* (2.002) *Cancer Gene Ther.* 9, 489-496). Las secuencias que facilitan la transducción de las proteínas son conocidas para los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a Dominios de Transducción de Proteínas.

Preferiblemente, dicha secuencia se selecciona del grupo que comprende la proteína TAT de VIH, una secuencia de poliarginina, penetratina y pep-1. Otros péptidos más, permeables a las células, usados comúnmente (péptidos tanto naturales como artificiales) se desvelan en Joliot A. y Prochiantz A. (2.004) *Nature Cell Biol.* 6 (3) 189-193.

5 Un segundo aspecto de una composición farmacéutica es el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas de interferón. En caso de que se use una secuencia de ácidos nucleicos codificando la molécula de interferón, se destina preferiblemente dicho medicamento a suministro de dicho ácido nucleico a la célula, en un tratamiento génico. Un gran número de métodos de suministro son conocidos para los expertos en la materia. Preferiblemente, los ácidos nucleicos se administran para usos en tratamiento génico *in vivo* o *ex vivo*. Sistemas de suministro de vectores no víricos incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico complejado con un vehículo de suministro tal como un liposoma. Los sistemas de suministro de vector vírico incluyen virus de ADN y ARN, que tienen genomas episómicos o integrados después de suministro a la célula. Los métodos de suministro no víricos de ácidos nucleicos incluyen lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, polimerización o conjugados de lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales y absorción de ADN activado por agente. Se describe la lipofección en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.049.386, la Patente de EE.UU. N° 4.946.787 y la Patente de EE.UU. N° 4.897.355 y los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para lipofección de reconocimiento de receptores eficaz de polinucleótidos incluyen los de Flegner, la patente internacional WO 91/17424, la patente internacional WO 91/16024. El suministro puede ser a células (administración *ex vivo*) o tejidos diana (administración *in vivo*). La preparación de complejos de lípido: ácido nucleico, incluyendo liposomas fijados como objetivo tales como complejos de inmunolípidos, es conocida para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Crystal, 1.995; Blaese *et al.*, 1.995; Behr, 1.994; Remy *et al.*, 1.994; Gao y Huang, 1.995; Patentes de EE.UU. Nos. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 y 4.946.787).

25 El uso de sistemas basados en ARN o AND vírico para el suministro de ácidos nucleicos aprovecha procedimientos altamente desarrollados para fijar como objetivo un virus a células específicas en el cuerpo y transportar la carga vírica al núcleo. Se pueden administrar vectores víricos directamente a pacientes (*in vivo*) o se pueden usar para tratar células *in vitro* y se administran las células modificadas a pacientes (*ex vivo*). Los sistemas con base vírica convencional para el suministro de ácidos nucleicos incluyen entre otros vectores retrovirales, lentivirus, adenovirales, adeno-asociados y del virus del herpes simple para transferencia génica. Los vectores víricos son en la actualidad el método el más eficaz y versátil de transferencia de genes en células y tejidos diana. La integración en el genoma del huésped es posible con los métodos de transferencia de genes de retrovirus, lentivirus y virus adeno-asociado, dando como resultado con frecuencia la expresión a largo plazo del transgen insertado. Adicionalmente, se han observado altas eficacias de transducción en muchos tipos de células diferentes y tejidos diana. En los casos en que se prefiere expresión transitoria del ácido nucleico, se pueden usar sistemas con base adenovírica, incluyendo vectores adenovíricos deficientes de replicación. Los vectores con base adenovírica son capaces de eficacia de transducción muy alta en muchos tipos de células y no requieren división celular. Con tales vectores, se han obtenido altos títulos y niveles de expresión. Este vector se puede producir en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. Los vectores de virus adeno-asociados ("VAA"), incluyendo vectores de virus adeno-asociados recombinantes también se usan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y para procedimientos de tratamientos génicos *in vivo* y *ex vivo* (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.797.368; la patente internacional WO 93/24641; Kotin, 1.994; la construcción de vectores de VAA recombinantes se describe en una serie de publicaciones, incluyendo la patente de EE.UU. N° 5.173.414; Hermonat & Muzyczka, 1.984; Samulski *et al.*, 1.989).

50 Se pueden suministrar vectores para tratamiento génico *in vivo* por administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratraqueal, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica. En una realización particular la invención también prevé el uso de un método terapéutico génico hidrodinámico.

55 Se desvela tratamiento génico hidrodinámico en la patente de EE.UU. 6627616 (Mirus Corporation, Madison) e implica el suministro intravascular de ácidos nucleicos no víricos codificando un interferón, según lo cual la permeabilidad de los vasos aumenta por ejemplo por la aplicación de un aumento de presión en el interior de dicho vaso o por la co-administración de compuestos que aumentan la permeabilidad de los vasos, tal como por ejemplo papaverina.

60 Alternativamente, se pueden suministrar vectores a células *ex vivo*, tales como células explantadas a partir de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejidos) o hemocitoblastos hematopoyéticos de donador universal, seguido por reimplantación de las células en un paciente, normalmente después de selección para células que han incorporado el vector. La transfección de células *ex vivo* para diagnóstico, investigación o para tratamiento de genes (por ejemplo, vía re-infusión de las células transfectadas en el organismo del huésped) es conocida para los expertos en la materia. En una realización preferida, se aíslan células del organismo objeto, se transfecta con un ácido nucleico (gen o ADNc) y vuelve a re-infundir en el organismo objeto (por ejemplo, paciente). Diversos tipos de células adecuados para transfección *ex vivo* son

conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Freshney *et al.*, 1.994 y las referencias citadas en la misma para una discusión de cómo aislar y cultivar células de pacientes).

En otra realización más, el método de interferencia de proteínas de la invención se puede usar para determinar la función de una proteína en una célula o un organismo que es capaz de mediar la interferencia de proteínas. La célula puede ser una célula procariota o puede ser una célula eucariota o puede ser una línea celular, por ejemplo una célula de planta o una célula de animal, tal como una célula de mamífero, por ejemplo una célula embrionaria, un hemocitoblasto pluripotente, una célula tumoral, por ejemplo una célula de teratocarcinoma o una célula infectada por virus. El organismo es preferiblemente un organismo eucariota, por ejemplo una planta o un animal, tal como un mamífero, en particular un ser humano.

La proteína diana a que se dirige la molécula de interferón de la invención se puede asociar con un estado patológico. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína asociada a patógeno, por ejemplo una proteína vírica, una proteína asociada a tumor o una proteína asociada a una enfermedad autoinmunitaria. La proteína diana también puede ser un gen heterólogo expresado en una célula recombinante o un organismo genéticamente modificado. Por inhibición de la función de dicha proteína se puede obtener información valiosa y beneficios terapéuticos en el campo agrícola o en la medicina o en campo de la medicina veterinaria. En una realización preferida en particular el método de la invención se usa con una célula eucariota o un organismo no humano eucariota que presenta un fenotipo inhibidor específico de la proteína diana que comprende una expresión al menos parcialmente deficiente de al menos una proteína diana endógena en la que se pone en contacto dicha célula o organismo con al menos una molécula de interferón capaz de inhibir la función de al menos una proteína diana endógena o con un vector codificando al menos una molécula de interferón capaz de interferir con la función y/o la presencia de al menos una proteína endógena. Se debería observar que la presente invención también permite una inhibición específica de la diana de diversas proteínas endógenas diferentes debido a la especificidad de la molécula de interferón.

Se pueden usar fenotipos de inhibición específicos de la proteína de células u organismos no humanos, en particular de células humanas o mamíferos no humanos en procedimientos analíticos, por ejemplo en el análisis funcional y/o fenotípico de procedimientos fisiológicos complejos tales como análisis de proteomas. Por ejemplo, se pueden preparar los fenotipos de inhibición de proteínas humanas en células cultivadas que se asume que son reguladores de procedimientos de corte y empalme alternativos. Entre éstos las proteínas son en particular los miembros de la familia del factor de corte y empalme SR, por ejemplo ASF/SF2, SC35, SRp20, SRp40 o SRp55. Además, se puede analizar el efecto de las proteínas SR en los perfiles de ARNm de genes cortados y empalmados alternativamente predeterminados tales como CD44.

Usando las tecnologías de eliminación a base de proteínas descritas en la presente memoria, la expresión de una proteína diana endógena se puede inhibir en una célula diana o un organismo diana. La proteína endógena puede ser complementada por un ácido nucleico diana exógeno codificando la proteína diana o una variante o forma mutada de la proteína diana, por ejemplo, un gen o un ADNc, que opcionalmente se puede fusionar a una secuencia de ácidos nucleicos adicional codificando un péptido o polipéptido detectable, por ejemplo, una etiqueta de afinidad, en particular una etiqueta de afinidad múltiple. Las variantes o las formas mutadas de la proteína diana difieren de la proteína diana endógena porque difieren de la proteína endógena por sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones de aminoácidos solos o múltiples. Las variantes o las formas mutadas pueden tener la misma actividad biológica que la proteína diana endógena. Por otra parte, la variante o proteína diana mutada también puede tener una actividad biológica, que difiere de la actividad biológica de la proteína diana endógena, por ejemplo una actividad parcialmente suprimida, una actividad completamente suprimida, una actividad mejorada, etc. La complementación se puede realizar por co-expresión del polipéptido codificado por el ácido nucleico exógeno, por ejemplo una proteína de fusión que comprende la proteína diana y la etiqueta de afinidad y la molécula de interferón para eliminar la proteína endógena en la célula diana. Esta co-expresión se puede realizar usando un vector de expresión adecuado que exprese tanto el polipéptido codificado por el ácido nucleico exógeno, por ejemplo la proteína diana modificada con etiqueta y la molécula de interferón o alternativamente usando una combinación de vectores de expresión o alternativamente la molécula de interferón se puede poner en contacto con la célula diana desde el exterior de la célula. Las proteínas y los complejos de proteínas que se sintetizan *de novo* en la célula diana contendrán la proteína exógena, por ejemplo la proteína de fusión modificada. Para evitar la supresión de la función de la proteína exógena con la molécula de interferón, la proteína exógena debe tener suficientes diferencias de aminoácidos en la región de agregación que se selecciona para el diseño de la molécula de interferón. Alternativamente, la proteína diana endógena se puede complementar mediante las correspondientes proteínas a partir de otras especies o la proteína diana endógena se puede complementar mediante una forma de empalme de dicha proteína diana. La combinación de eliminación de una proteína endógena y rescate por el uso de mutada, por ejemplo diana exógena parcialmente suprimida tiene ventajas comparado con el uso de una célula de eliminación. Además, este método es adecuado en particular para identificar dominios funcionales de la proteína diana.

En otra realización preferida, se realiza una comparación, por ejemplo de perfiles de expresión de genes y/o proteomas y/o características del fenotipo de al menos dos células u organismos. Estos organismos se seleccionan de: (i) una célula de control u organismo de control sin inhibición de proteína diana, (ii) una célula o un organismo

con inhibición de proteína diana y (iii) una célula o un organismo con inhibición de proteína diana más complementación de proteína diana por un ácido nucleico diana exógeno que codifica dicha proteína diana.

Los métodos de la invención son también adecuados en un procedimiento para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos, por ejemplo identificar nuevos agentes farmacológicos a partir de una colección de sustancias de ensayo y/o mecanismos de caracterización de acción y/o efectos secundarios de agentes farmacológicos conocidos. Así, la presente invención también se refiere a un sistema para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos que actúan sobre al menos una proteína diana que comprende: (a) una célula eucariota o un organismo no humano eucariota capaz de expresar al menos un gen diana endógeno que codifique dicha proteína diana, (b) al menos una molécula de interferón capaz de inhibir la expresión de al menos dicho gen diana endógeno y (c) una sustancia de ensayo o una recopilación de sustancias de ensayo en la que las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de ensayo o dicha recopilación se tienen que identificar y/o caracterizar. Además, el sistema como se describió anteriormente comprende preferiblemente: (d) al menos un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una variante o forma mutada o forma de empalme de la proteína diana en la que dicha proteína diana exógena difiere de la proteína diana endógena en el nivel de aminoácido de las regiones de agregación de manera que la función de la proteína diana exógena está sustancialmente menos inhibida por la molécula de interferón que la expresión de la proteína endógena.

Además, la invención también comprende células y organismos que comprenden una molécula de interferón. Un organismo puede ser, por ejemplo, una planta transgénica que soporta la información genética que codifica un interferón. Dicha planta transgénica es, en una realización preferida, una planta silenciada (es decir, en que una proteína diana particular está regulada por disminución debido a la presencia de un interferón específico en un subconjunto de células u órganos o está presente en todas las células y órganos de dicha planta). Las células que comprenden un interferón pueden ser producidas poniendo en contacto dichas células o por electroporación de dichas células con una molécula de interferón particular. En una realización particular las células que comprenden un interferón son generadas por transinfección (o transformación) en las que el interferón está codificado por un vector de expresión recombinante tal como un plásmido o un vector vírico.

AISLAMIENTO: SEPARACIÓN y DETECCIÓN

En otra realización, la invención proporciona un método para aislar una proteína de una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación presente en dicha proteína y aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

En otra realización más, la invención proporciona un método para aislar una proteína de una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína en la que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación y aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

En otra realización más, la invención proporciona un método para aislar una proteína de una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de autoasociación aislada de dicha proteína en la que dicha región de autoasociación se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de autoasociación a fin de que dicha región de autoasociación esté en contacto directo con el disolvente en el que dicha región de autoasociación se fusiona a dicho resto y dicha proteína está presente y aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

En otras palabras la invención proporciona un método para el aislamiento de una proteína de una muestra que comprende:

- poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende un péptido, dominio proteico o perla de agarosa, que evita la agregación de la parte B, y ii) la parte B que comprende al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B y

- aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

En otras palabras más, la invención proporciona un método para el aislamiento de una proteína de una muestra que comprende:

- poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende un péptido, dominio proteico o perla de agarosa, que evita la agregación

de la parte B, y ii) la parte B que comprende al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B y en la que la parte B está en contacto directo con el entorno en el que dicha molécula y proteína están presentes y

5

- aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

En otras palabras más, la invención proporciona un método para el aislamiento de una proteína de una muestra que comprende:

10

- poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende un péptido, dominio proteico o perla de agarosa, que evita la agregación de la parte B, y ii) la parte B que consiste en al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B, y en la que la parte B está en contacto directo con el entorno en el que están presentes dicha molécula y proteína y

15

- aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

20

En otras palabras más, la invención proporciona un método para el aislamiento de una proteína de una muestra que comprende:

25

- poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende parte A y parte B en la que i) la parte A comprende un péptido, dominio proteico o perla de agarosa, que evita la agregación de la parte B, y ii) la parte B que consiste en al menos 1 región de autoasociación en la que dicha región consiste en al menos 3 aminoácidos contiguos y en la que dicha región se aísla de dicha proteína y en la que un ligador está opcionalmente presente entre las partes A y B y

30

- aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra.

SEPARACIÓN

En una realización más, el método para el aislamiento de al menos una proteína comprende además la separación de al menos una proteína de una muestra.

35

Una aplicación de la separación de al menos una proteína de una muestra es la eliminación (o reducción) de proteínas muy abundantes de una muestra. Por supuesto, un principal reto en el descubrimiento fijado como objetivo de proteínas y la validación es cómo diseccionar específicamente muestras de proteínas complejas (por ejemplo plasma, orina, fluido cerebroespinal) y medir dianas traza. Las proteínas abundantes son con frecuencia 6-10 órdenes de magnitud más concentradas que las proteínas poco abundantes. Así, las proteínas muy abundantes se deben retirar para detectar y medir proteínas traza de importancia médica. Puesto que la albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina constituyen aproximadamente el 90% del contenido total en proteína en suero humano, hay una necesidad crítica de herramientas de diagnóstico para reducir rápidamente estas proteínas abundantes no deseadas y desenmascarar los biomarcadores de proteínas de bajo peso molecular menos abundantes. Ya se usan diversos métodos en la técnica: 1) inmunoglobulina G (IgG) como reactivos de afinidad para capturar y separar dianas proteicas abundantes, 2) inmunoglobulina yema (IgY) son anticuerpos de tipo IgG aislados de yemas de huevo de pájaros inmunizados, 3) se usa pre-fraccionamiento para separar una mezcla de proteínas en diferentes fracciones para retirar ciertas proteínas en la mezcla original y 4) la proteína A y la proteína G son proteínas de pared celular bacteriana con una especificidad para anticuerpos IgG, por lo tanto las resinas de afinidad por la proteína A y G proporcionan una eliminación de IgG y 5) se usan microperlas de IgG e IgY para detección de proteínas.

50

DETECCIÓN

55

En otra realización específica, el método para el aislamiento de al menos una proteína comprende además la detección de al menos una proteína en dicho complejo molécula-proteína.

60

La detección se puede llevar a cabo por separación del complejo de molécula de interferón-proteína diana por ejemplo por electroforesis, cromatografía de columna, filtración, atracción electrostática, atracción magnética o paramagnética, espectrometría de masas y similares.

65

Las tecnologías de biodetección más ampliamente usadas están basadas en el uso de anticuerpos. Los anticuerpos reconocen y se unen a otras moléculas basándose en su forma y propiedades fisicoquímicas. Los anticuerpos son muy adecuados para detectar pequeñas cantidades de proteínas diana en presencia de mezclas complejas de proteínas. La presente invención muestra que el uso de moléculas de interferón (la parte B presenta la especificidad

y el reconocimiento para al menos una proteína específica) es una alternativa para el uso de anticuerpos (como elemento de reconocimiento) para la captura específica de proteínas diana. Por supuesto, las moléculas de interferón se pueden usar en numerosas aplicaciones en que se usan típicamente anticuerpos. Para nombrar sólo algunas, se prevén aplicaciones en diagnóstico, micro-analítica, ciencia forense y en la detección específica de patógenos.

Para las aplicaciones de detección y separación de la invención, se prefiere que la parte B de la molécula de interferón esté ligada a un portador que se designe en la presente memoria como parte A. Un portador puede ser una superficie plana tal como plástico o nitrocelulosa o una columna cromatográfica pero es preferiblemente una perla tal como perlas de microesferas. Una discusión general sobre diversos tipos de perlas y microesferas, que sirven el fin de ser parte A de las moléculas de interferón, se describe en las páginas 9 y 10 de la patente de EE.UU. 6682940 y se incorpora en la presente memoria específicamente por referencia.

En una realización particular, la parte A de la molécula de interferón es un tipo de portador de carbohidrato, por ejemplo celulosa o agarosa. La parte B puede estar unida mediante enlaces covalentes a dicho portador de carbohidrato con un agente de reticulación tal como glutaraldehído.

En otra realización particular, la parte A es un soporte tal como celulosa, vidrio o un polímero sintético. La unión covalente entre la parte A y la parte B se puede realizar vía restos de aminoácido de la parte B y una azida, carbodiimida, isocianato u otros derivados químicos presentes en la parte A.

En otra realización particular más, la parte A es una microperla de vidrio silanizada porosa. La parte B puede estar unida mediante enlaces covalentes a la parte A vía sus grupos amino peptídicos (por reacción de Schiff seguido por reducción con borohidruro de sodio) a grupos aldehído formados por oxidación de peryodato de grupos glicidoxipropilsilano unidos de manera química a los átomos de silicio (este acoplamiento se describe en Sportsman y Wilson (1.980) Anal. Chem. 52, 2.013-2.018).

En una realización específica la parte A del portador está envuelta por una película proteínica a cuya parte A se reticula (véanse las reivindicaciones 1-50 y los ejemplos relativos al portador en la patente de EE.UU. 4478946).

En otra realización específica, la parte A es una perla fluorescente tal como una partícula de látex fluorescente. La patente de EE.UU. 4550017 y especialmente la página 4 en la misma, describe compuestos fluorescentes que se pueden usar para la fabricación de perlas fluorescentes.

En otra realización específica las perlas, parte A, varían de tamaño y también pueden contener o impregnarse con colorantes fluorescentes. Debido a tamaños variables y colorantes de las perlas se pueden detectar múltiples proteínas y cuantificar en una sola reacción. Los procedimientos para el desarrollo de tales perlas se describen en la patente de EE.UU. 6159748.

En otra realización particular más, el acoplamiento entre la parte A (la perla) y la parte B es vía una poli(treonina), una poli(serina), dextrano o poli(etilenglicol). Los Ejemplos 6, 7, 8 y 9 de la patente de EE.UU. 6399317 ilustran cómo se puede realizar este acoplamiento.

En otra realización particular más, la parte A es una perla magnética. Las perlas magnéticas, acoplamiento entre las perlas magnéticas y un agente proteínico y sus usos se describen en la página 8 de aplicación de la patente de EE.UU. 6489092.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por los expertos en la materia a que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales cualesquiera similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Los términos "un" y "una" se usan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "una proteína diana" significa una proteína diana o más de una proteína diana.

Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, dimensión, tamaño o cantidad que varía por tanto como 30%, preferiblemente por tanto como 20% y más preferiblemente por tanto como 10% para una cantidad, nivel, valor, dimensión, tamaño o cantidad de referencia.

"Reactivo de reticulación bifuncional" significa un reactivo que contiene dos grupos reactivos, teniendo el reactivo de ese modo la capacidad para ligar mediante enlaces covalentes dos elementos tales como la parte A y la parte B de

la molécula de interferón. Los grupos reactivos en un reactivo de reticulación pertenecen típicamente a las clases de grupos funcionales incluyendo ésteres succinimidílicos, maleimidados y haloacetamidas tales como yodoacetamidas. Por toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos establecidos pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

Por "vector de expresión" o "vector recombinante" se quiere decir cualquier elemento genético autónomo capaz de dirigir la síntesis de una molécula de interferón codificada por el vector. Tales vectores de expresión son conocidos para los profesionales habilitados en la técnica.

Por "derivado" se quiere decir una molécula de interferón que ha procedido de la secuencia básica por modificación, por ejemplo por conjugación o complejación con otros restos químicos (por ejemplo pegilación) o por técnicas de modificación post-traduccionales como se entendería en la técnica. El término "derivado" también incluye dentro de su alcance modificaciones que se han hecho para una secuencia precursora incluyendo adiciones o deleciones que proporcionan moléculas equivalentes de manera funcional.

Por "cantidad eficaz", en el contexto de la modulación de una actividad o de tratamiento o prevención de una afección se quiere decir la administración de esa cantidad de una molécula de interferón a un individuo con necesidad de tal modulación, tratamiento o profilaxis, en una sola dosis o como parte de una serie, que sea eficaz para modulación de ese efecto o para tratamiento o profilaxis de esa afección. La cantidad eficaz variará dependiendo de la salud y estado físico del individuo que se tiene que tratar, el grupo taxonómico del individuo que se tiene que tratar, la formulación de la composición, la valoración de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encontrará en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar por pruebas de rutina.

Por "aislada" se quiere decir material que está sustancialmente o esencialmente exento de componentes que normalmente le acompañan en su estado original. Por ejemplo, un "polipéptido aislado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido, que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, una secuencia de autoasociación que se ha retirado de las secuencias que están normalmente adyacentes a dicha secuencia. Una secuencia de autoasociación (opcionalmente acoplada a un resto que evita la agregación) se puede generar por síntesis química de aminoácidos o se puede generar por producción recombinante.

El término "oligonucleótido" como se usa en la presente memoria se refiere a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos) ligados vía enlaces fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos). Un oligonucleótido es típicamente más bien corto de longitud, generalmente de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, pero el término se puede referir a moléculas de cualquier longitud, aunque el término "polinucleótido" o "ácido nucleico" se usa típicamente para oligonucleótidos grandes. El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" como se usa en la presente memoria designa ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término se refiere típicamente a oligonucleótidos mayores que 30 nucleótidos de longitud.

El término "polinucleótido recombinante" como se usa en la presente memoria se refiere a un polinucleótido formado in vitro por la manipulación de ácido nucleico en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, el polinucleótido recombinante puede estar en forma de un vector de expresión. Generalmente, dichos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional ligados de manera operable a la secuencia de nucleótidos.

Por "ligado de manera operable" se quiere decir que los ácidos nucleicos reguladores transcripcionales y traduccionales están situados en relación con un polinucleótido que codifica al polipéptido de tal manera que el polinucleótido se transcribe y se traduce el polipéptido.

Los términos "sujeto" o "individuo" o "paciente", usados de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a cualquier sujeto, en particular un sujeto vertebrado e incluso más en particular un sujeto mamífero, para quien se desea tratamiento o profilaxis. Los animales vertebrados adecuados que se encuentran dentro del alcance de la invención incluyen, pero no están restringidos a, primates, aves, peces, reptiles, ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, caballos, asnos, cerdos), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, conejos, ratones, ratas, conejillos de indias, hámsters), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros) y animales salvajes cautivos (por ejemplo, zorros, ciervo, dingos). Sin embargo, se entenderá que los términos ya mencionados no implican que estén presentes síntomas.

Por "portador farmacéuticamente aceptable" se quiere decir una carga, diluyente o sustancia de encapsulamiento sólida o líquida que se puede usar con seguridad en administración tópica o sistémica a un paciente.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un

polímero de restos de aminoácido y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Así, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácidos son un aminoácido que no se encuentra en la naturaleza sintético, tal como un análogo químico de un correspondiente aminoácido que se encuentra en la naturaleza, así como a polímeros de aminoácidos que se encuentran en la naturaleza.

Por "polipéptido recombinante" se quiere decir un polipéptido fabricado usando técnicas recombinantes, es decir, por la expresión de un polinucleótido recombinante o sintético. Cuando el polipéptido quimérico o porción biológicamente activa del mismo se produce de manera recombinante, también está preferiblemente sustancialmente exento de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10% y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de proteínas.

El término "identidad de la secuencia" como se usa en la presente memoria se refiere a la extensión en que las secuencias son idénticas sobre una base nucleótido por nucleótido o una base aminoácido por aminoácido por una ventana de comparación. Así, un "porcentaje de identidad de la secuencia" se calcula por comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima por una ventana de comparación, determinando el número de posiciones en que la base de ácidos nucleicos idénticos (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácidos idénticos (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) tiene lugar en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones equiparadas, dividiendo el número de posiciones equiparadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Para los fines de la presente invención, "identidad de la secuencia" se entenderá que significa el "porcentaje equiparado" calculado por el programa informático DNASIS (Versión 2.5 para windows; disponible en Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, Calif., USA) usando defectos estándar cuando se usa en el manual de referencia que acompaña al software. "Similitud" se refiere al porcentaje del número de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras. La similitud se puede determinar usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux et al. 1.984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferentes a las citadas en la presente memoria se podían comparar por inserción de huecos en la alineación, determinándose tales huecos, por ejemplo, por la comparación del algoritmo usado por GAP.

El término "transformación" significa modificación del genotipo de un organismo, por ejemplo una bacteria, levadura o planta, por la introducción de un ácido nucleico extraño o endógeno. Los vectores para transformación incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus animales, los YAC (cromosoma artificial de levadura, por sus siglas en inglés), los BAC (cromosoma artificial bacteriano, por sus siglas en inglés) y similares. Por "vector" se quiere decir una molécula de polinucleótido, preferiblemente una molécula de ADN procedente, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en que se puede insertar o clonar un polinucleótido. Un vector contiene preferiblemente uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula huésped definida incluyendo una célula o tejido diana o una célula o tejido progenitor de los mismos o ser integrable con el genoma del huésped definido de manera que sea reproducible la secuencia clonada. De acuerdo con esto, el vector puede ser un vector de replicación de manera autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido circular lineal o cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autoreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en que se ha integrado. Un sistema vector puede comprender un solo vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que contienen juntos el ADN total que se tiene que introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en que se tiene que introducir el vector. En una realización preferida, el vector es preferiblemente un vector vírico o derivado de vírico, que es funcional de manera operable en células de animal y preferiblemente de mamífero. El vector también puede incluir un marcador de selección tal como un gen de resistencia de los antibióticos que se pueda usar para la selección de transformantes adecuados. Ejemplos de tales genes de resistencia son conocidos por los expertos en la materia e incluyen el gen nptII que confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y G418 (Geneticin®) y el gen hph que confiere resistencia al antibiótico higromicina B.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales útiles a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos sólo son ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Ejemplos

1. Diseño de un péptido sintético molécula de interferón

Se construyó una molécula de interferón en la que la parte B consiste en tres regiones autoasociadas sintéticas con ligadores cortos de dos aminoácidos (STLIVL-QN-STVIFE-QN-STVIFE) interconectando las regiones de autoasociación. Dichas tres regiones de autoasociación son hexapéptidos que presentan una fuerte tendencia a agregarse, véase la Fig. 1 para el diseño de la molécula de interferón. Nota: en el texto de esta invención todas las secuencias de aminoácidos se representan empezando desde la parte que termina en amino y se lee en la dirección de la parte que termina en carboxi - así, "STLIVL" se lee como "NH₂-STLIVL-COOH"). La parte B de la molécula de interferón sintética se fusionó de manera terminal a N a un resto (parte A) que evita la agregación y pone las regiones de autoasociación en contacto directo con el entorno (en la presente memoria el citosol de *E. coli*). (La Fig. 1 representa la estructura del diseño de interferón sintético). Dicho resto es la proteína NusA, que se usa con frecuencia como una etiqueta de solubilización en la producción¹³ de proteínas recombinantes. La molécula de interferón sintética resultante (estructura A-B) se podía fabricar y purificar de una manera recombinante en *E. coli*.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de la molécula de interferón sintética (sin ninguna secuencia de autoasociación específica para una proteína *E. coli* particular) no evita el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, se transformaron células *E. coli* BL21 con la construcción de interferón sintética presente en el plásmido pETM60 (regalo de G. Stier, EMBL). En el último plásmido los interferones están bajo control del promotor T7 quimérico (véase la sección materiales y métodos). Se cultivaron recombinantes a una densidad de OD 0,6, el interferón se expresó con la adición de 0,5 µM de IPTG durante 3 horas a 37°C y se puso en placa la suspensión bacteriana en placas de agar. Se inspeccionaron las placas después de 12 h de incubación a 37°C y mostraron abundante crecimiento bacteriano.

En una etapa a continuación una secuencia de ligador flexible ("KPGAAGK" - representada como 'ligador' en la figura 1) se acopló al COOH final de la construcción de interferón sintético para permitir la fusión de secuencias de autoasociación procedentes de una proteína diana.

2. Interferencia de proteínas en procariontas

En el presente ejemplo se eligieron proteínas *E. coli* que se tenían que regular por disminución, de las cuales una interferencia de proteínas funcionales confiere un rasgo seleccionable. Las proteínas diana del proteoma *E. coli* se seleccionaron con una localización citosólica y la presencia de una región de agregación con una puntuación TANGO alta adecuada. Como la auxotrofia condicional para un solo aminoácido puede ser ensayada de manera conveniente usando medio de cultivo con composición controlada, se seleccionaron cuatro enzimas candidatas implicadas en la síntesis de isoleucina (entrada UniProt¹⁵: ILVI_ECOLI), metionina (entradas UniProt¹⁵: METE_ECOLI y METK_ECOLI) y leucina (entrada UniProt¹⁵: LEU1_ECOLI). Las secuencias de autoasociación basadas en la puntuación de predicción de TANGO de las cuatro proteínas fue para ILVI_ECOLI: "GWLVTSG", puntuación TANGO: 44, para METE_ECOLI: "LLLTTYF", puntuación TANGO: 32, METK_ECOLI: "LTLV", puntuación TANGO: 20 y LEU1_ECOLI: "LAFIG", puntuación TANGO: 15. La información genética para la molécula de interferón sintética del ejemplo 1 se fusionó a la secuencia de ADN que codifica las respectivas regiones de autoasociación de las cuatro enzimas biosintéticas que resultan de cuatro moléculas de interferón específicas. Para mostrar interferencia de proteínas *in vivo* (que es esencialmente una co-agregación entre el interferón específico (para una enzima biosintética) y la propia enzima biosintética) se procede como sigue. Se transformaron *E. coli* con el plásmido que comprende las respectivas construcciones de interferón y creciendo en medio rico hasta el comienzo de la fase de crecimiento exponencial, cuando se indujo expresión de proteínas de interferón con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido). Se permitió que la expresión de las proteínas transcurriera a 37°C, se recogieron las células, se lavaron con una disolución de sal para retirar IPTG en exceso y medio rico y se pusieron en placas en placas de agar que contenían medio M9 mínimo completado con los veinte aminoácidos que se encuentran en la naturaleza (denominado medio completo M9) y en medio M9 mínimo con todos los aminoácidos excepto uno para el que se tiene que ensayar la auxotrofia (denominado M9 selecto). Se mostró que para tres de cada cuatro enzimas fijadas como objetivo, se podía conseguir una eliminación funcional completa, es decir, se encontraron condiciones en que las bacterias formaban colonias en placas de agar de M9 completo pero no en M9 selecto. La expresión de las construcciones de interferón y su presencia exclusiva en la fase insoluble del lisado celular se confirmó por método western. Para las cuatro enzimas ensayadas en la presente memoria, se observó una clara relación entre su sensibilidad para la propuesta de coagregación y su tendencia prevista a la agregación según el algoritmo TANGO, que confirma además la calidad de las predicciones TANGO así como su importancia en un contexto celular funcional. La proteína ILVI, que presenta la puntuación TANGO más alta, fue eliminada casi completamente por la débil expresión del promotor T7 en ausencia de cualquier IPTG y una hora de sobreexpresión inducida conduce a una eliminación funcional total. Las enzimas METE y METK presentan una puntuación TANGO intermedia y no se vieron afectadas por una sola hora de sobreexpresión del interferón. Sin embargo después de tres horas de inducción de IPTG la función se perdió completamente y no se pudo detectar formación de colonias. Se observó la puntuación de agregación más débil para la enzima LEU1 y la sobreexpresión en este caso producía sólo una modesta regulación con disminución de su actividad. De manera notable, la eliminación funcional de las enzimas fijadas como objetivo es reversible. Cuando las células cargadas con un alto nivel de material de interferón sobreexpresado se pusieron en placas en agar LB, presentaron crecimiento normal de colonias. Cuando se copiaron estas colonias en M9 selecto, se observó de nuevo crecimiento normal. Esto indica que durante el crecimiento de colonias se perdieron agregados restableciéndose la red celular a normal.

3. Interferencia de proteínas de dianas que comprenden regiones de autoasociación con una baja puntuación de autoasociación

Las regiones de autoasociación con frecuencia están flanqueadas o contienen restos cargados tales como R, K, D y E pero también P y G (denominados restos de aminoácidos que controlan directamente la proliferación celular) (véase Rousseau, Serrano & Schymkowitz (2.006) How Evolutionary Pressure Against Protein Aggregation Shaped Chaperone Specificity, *J Mol Biol*, doi:10.1016/j.jmb.2005.11.035). Estos restos que controlan directamente la proliferación celular reducen la tendencia a la autoasociación de las secuencias a las que están asociadas. Para optimizar la sensibilidad de la parte B de una molécula de interferón para coagregarse con una proteína diana determinada, la región de autoasociación de la proteína diana que está incluida en la parte B del interferón puede mutar a fin de que se reemplacen los restos ya mencionados por restos que fomentan la agregación tal como L, V, I, F, W, Y pero también pueden estar incluidos otros restos que pueden aumentar la tendencia a la autoasociación de la región de autoasociación. La región de autoasociación mutada (procedente de la proteína diana) que se incluye en la parte B de la molécula de interferón tiene una homología de secuencia de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 90%, con la región de autoasociación de la proteína diana. Además, algunos aminoácidos son neutros en términos de agregación y reemplazar dichos aminoácidos con aminoácidos que favorecen la agregación también aumentará la tendencia a la autoasociación de una región (por ejemplo S,T,C pero también se pueden reemplazar Q, N, H, M por restos propensos a la agregación tales como L, V, I, F, W, Y. Estas moléculas de integrador optimizadas aumentan la interferencia de las proteínas de dianas con una puntuación de agregación baja prevista. En el ejemplo 2 se mostró que la interferencia de las proteínas de la enzima LEU1 de *E. coli* es menos eficaz. En este ejemplo se optimiza la molécula de interferón con una especificidad para la enzima LEU1. La secuencia de autoasociación identificada en LEU1 es "LAFIG". La última secuencia está flanqueada por los restos que controlan directamente la proliferación celular "...DYDLEALAFIGKQEE..." por lo tanto para mejorar de manera mutacional la secuencia diana se emplea una estrategia basada en degenerar pcr como sigue: se designa que los cebadores complementarios tienen una superposición de 20-25 pb en cada lado del codón que mutará para permitir hibridación eficaz de los cebadores del iniciador. Se introduce un codón degenerado por incorporación de una relación equimolar de las cuatro bases durante la síntesis del cebador (un denominado codón NNS). Usando el protocolo Quickchange PCR con este cebador degenerado, se obtiene una colección que contiene las 20 mutaciones puntuales de la posición de flanco. Esta colección se multiplica en células Top10 (Invitrogen) y el ADN del plásmido se purifica usando el estuche miniPrep (Qiagen). Para ensayar si aumenta la eficacia de la eliminación, se transforman interferones mutantes (el diseño se realiza como en el ejemplo 2) contra la diana LEU1 en células BL21 (Invitrogen) y se pusieron en placas en placas de agar LB. En una placa de 96 pozos que contenía 0,2 ml de LB + antibiótico por pozo, se inocula cada pozo recogiendo colonias individuales. Se incubó la placa a 37°C hasta que se alcanza un OD de 0,6, cuando la expresión de los interferones mutantes se induce por adición de 0,5 µM de IPTG durante 3 horas a 37°C. El contenido completo de cada pozo, excepto 1 µl se puso en placas en un medio mínimo selectivo que contenía todos los aminoácidos excepto leucina. Para los clones que muestran diferentes gradaciones de crecimiento debilitado en las placas selectivas, reactivo TempliPhi (GE Health Science) se añade para multiplicación de ADN y se transfiere la placa para facilidad de secuenciación. La información de las secuencias nos proporciona el espectro completo de moléculas de interferón mutadas con LEU1 optimizadas.

4. Uso de moléculas de interferón para la reducción de inmunoglobulina G de suero

En este experimento de reducción se elige una perla de agarosa como un resto (parte A) al que se fusionan regiones de autoasociación procedentes de una proteína diana vía enlace químico aminoreactivo. Tales materiales de agarosa están comercialmente disponibles, tal como 4 Fast Flow Sefarose™ activada con NHS de GE healthcare. La inmunoglobulina G humana tiene dos regiones (I) tango fuertes IIVAVVIATAVAAIVAAVVALIY y II) LTVLLLLASA) que se pueden usar como regiones de autoasociación. Como las escalas de gasto de péptido con longitud en aminoácidos, se diseña que los péptidos contengan 10 fracciones de aminoácidos desde la primera región diana. Las secuencias diana (regiones de autoasociación) son precedidas con la secuencia de ligador ADPRGAAEAGA y se sintetizaron con extremos desprotegidos para mantener el grupo amino N-terminal reactivo. Las secuencias diseñadas son: a) ADPRGAAEAGIIVAVVIATA, b) ADPRGAAEAGAVVIATAVAAI, c) ADPRGAAEAGIIVAAVVALIY (a), b) y c) comprenden decapeptidos procedentes de la región tango fuerte I) y d) ADPRGAAEAGLTVLLLLASA comprende región II) tango. Para reducción, se incubaron 10 ml de suero con 1 mg de péptido inmovilizado a 25, 30, 37 y 45°C durante 1 hora. Se recogieron perlas de agarosa por centrifugación y se retiró el suero, se lavaron las perlas de agarosa en tampón PBS para retirar la impureza restante. Se transfieren las perlas con posterioridad a tampón SDS y se incubaron a 95°C durante 10 minutos y se aplicó agitación vorticial mucho. Se investigó la presencia de IgG usando SDS-PAGE. Se confirmó la identidad de la diana usando espectrometría de masas.

5. Uso de moléculas de interferón para detección

Se diseñaron moléculas de interferón para la detección específica de 3 proteínas recombinantes comercialmente disponibles (citrate sintasa de corazón porcino (Roche), beta-galactosidasa de *E. coli* (Sigma) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma). A esto se determinaron regiones de autoasociación en una primera etapa con el algoritmo TANGO a partir de las siguientes proteínas diana:

a) citrato sintasa (CISY_PIG): "ALFWLLVT" (puntuación TANGO 60),

5 b) beta-galactosidasa (BGAL_ECOLI): "AVIIWSLGN" (puntuación TANGO 30) y "ALAVVLQ" (puntuación TANGO 42), y

c) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD_LEUME): "AFVDAISAVYTA" (puntuación TANGO 41).

10 En una etapa a continuación se acopló biotina de manera terminal con amino a las 4 diferentes regiones de autoasociación que resultan de 4 diferentes moléculas de interferón: i) biotina-ALFWLLVT con una especificidad para citrato sintasa, ii) biotina-AVIIWSLGN y biotina-ALAVVLQ con una especificidad para beta-galactosidasa y iii) biotina-AFVDAISAVYTA con una especificidad para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se adquirieron péptidos biotinilados de Jerine Peptide Technologies. Obsérvese que el diseño de interferón: biotina - región de autoasociación se corresponde con la estructura A-B en la que la biotina (parte A) evita la agregación de la región de autoasociación (parte B) y pone la región de autoasociación en contacto directo con el disolvente (PBST) en el que está presente dicha biotina-región de autoasociación.

15 Se prepararon pruebas dotblots individuales por manchado de 0,3 mg de cada proteína diana en membrana de nitrocelulosa, seguido por secado al aire e incubación durante la noche en BSA-PBST al 1% (PBS con Tween-20 al 0,1%) para bloquear sitios de unión no específicos. Se sumergió la membrana en una disolución 10 mM de péptido de detección biotinilado y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación. Después de repetir lavado con tampón, se confirmó la unión del péptido a la proteína por visualización del resto de biotina usando estreptavidina-HRP (Peroxidasa de Rábano, Pierce) y detección por quimioluminiscencia usando un sistema de cámara CCD.

25 6. Uso de moléculas de interferón frente a VEGF de murina para el tratamiento de angiogénesis retiniana patológica

30 La neovascularización retiniana es una causa principal de ceguera en el mundo y la angiogénesis retiniana patológica es una ruta común final que conduce a pérdida de visión en enfermedades tales como retinopatía de la prematuridad (ROP, por sus siglas en inglés), retinopatía diabética y degeneración macular asociada a la edad. Se sabe que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) es una de las piezas clave en el desarrollo de angiogénesis patológica. Se estudia el efecto de moléculas de interferón frente a VEGF en dos modelos de retinopatía inducida murinos. En un primer modelo, se exponen ratones neonatales (con una vasculatura retiniana inmadura) a hiperoxia, dando como resultado la erradicación de los vasos sanguíneos que se desarrollan suministrando oxígeno a la retina. Cuando los ratones vuelven después a normoxia, la retina, distal a los vasos ocluidos, se hace isquémica, induciendo la producción de VEGF y por último dando como resultado neovascularización retiniana proliferativa reproducible y cuantificable (el modelo se detalla en Pierce EA et al (1.995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (3) 905-9, véanse los procedimientos experimentales en la página 905 – modelo de ratón). En resumen, crías de ratón de 7 días (P7) junto con sus madres lactantes, son sometidas a hiperoxia (75% de oxígeno) en cámaras de oxígeno diseñadas especialmente para 5 días, sin abrir las jaulas. En P12, se devolvieron los animales al aire ambiente hasta P17, cuando se valoró en las retinas la respuesta máxima neovascular. En P12 la mitad de los animales son tratados con una molécula de interferón frente a VEGF y la mitad se dejaron sin tratar. La mitad de los ratones tratados recibió interferón VEGF mediante inyección intravítrea mientras la otra mitad del grupo tratado recibió interferón VEGF mediante inyección periocular (la inyección periocular o intravítrea se realiza como se describe en Shen J et al (2.006) Gene Therapy, publicación online adelantada el 29 de septiembre). Se usan tres moléculas de interferón diferentes frente a la isoforma VEGF165 murina en un intervalo de concentración de 1-100 µg/ml.

50 a) REAG-FLLSWVHWTLALLLYLHH-GGEERAG: esta molécula de interferón presenta la estructura A-B-A' de una molécula de interferón. La región de autoasociación procedente de VEGF165 murino (subrayado) está flanqueada por las regiones A de solubilización (REAG y GGEERAG) o en otras palabras las regiones A y A' evitan la agregación de la región de autoasociación (parte B de la molécula de interferón).

55 b) STVIIIE-GGAG-NHVTLS-GGAGQ-FLLSWVHWTLALLLYLHH-GERAG: esta molécula de interferón presenta la estructura B-A de una molécula de interferón. La parte A de solubilización (GERAG) se muestra en cursiva. La parte B presenta la siguiente estructura: STVIIIE (=región de autoasociación sintética) - GGAG (=un ligador) - NHVTLS (=región de autoasociación sintética) - GGAGQ (=un ligador) - FLLSWVHWTLALLLYLHHG (=la región de autoasociación procedente de VEGF165 murino).

60 c) STVIIIE-GGAG-FLLSWVHWTLALLLYLHH-GERAG: esta molécula de interferón presenta la estructura B-A de una molécula de interferón. La parte A de solubilización (GERAG) se muestra en cursiva. La parte B presenta la siguiente estructura: STVIIIE (=región de autoasociación sintética) - GGAG (=un ligador entre las regiones de autoasociación) - FLLSWVHWTLALLLYLHH (=la región de autoasociación sintética procedente de VEGF165 murino).

65 En P17 se perfusionaron ratones anestesiados a través del ventrículo izquierdo con 1 ml de disolución salina

tamponada con fosfato que contenía 50 mg de fluoresceína-dextrano de peso molecular 2×10^6 . Se retiraron los ojos y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 3 (ojo derecho) o 24 (ojo izquierdo) h. Se retiraron las lentes de los ojos derechos y se cortaron las retinas periféricas para permitir el montaje plano con glicerol-gelatina. Se analizaron las retinas montadas planas por microscopía de fluorescencia. Se embebieron los ojos izquierdos en parafina y se cortaron secciones de 6 μm en serie sagitalmente por toda la cornea, paralelo al nervio óptico y se marcaron con hematoxylin-eosina. Se cuantificó la respuesta neovascular proliferativa contando el número de vasos nuevos (= copos) y el número de células endoteliales que se extienden desde la membrana limitante interna de la retina en el vítreo en secciones transversales sagitales marcadas. La técnica angiográfica usando perfusión de fluoresceína-dextrano se usa junto con este método de recuento para investigación rápida de retinas o como un sistema de graduación alternativo para evaluación cuantitativa. En un segundo modelo se imita de manera experimental neovascularización retiniana por trombosis venosa inducida por láser en la retina. El modelo se describe en Saito Y et al (1.997) Curr. Eye Res. 16 (1): 26-33. Chi-Chun Lai et al (2.005) Acta Oftalmológica Escandinava 83: 590-594, describen en la sección materiales y métodos en las páginas 591-592 que el modelo se puede cuantificar. La aplicación de las moléculas de interferón VEGF se realiza como se describió antes en la presente memoria.

7. Interferencia de proteínas en una línea celular humana

La modulación de la muerte celular programada (inducción o supresión) es fácil de controlar en un sistema celular. Se sabe que la estaurosporina induce la muerte celular programada de una manera dependiente de p53. Así, la regulación por disminución de p53 o la regulación por disminución de las proteínas que mejoran la función de p53 (por ejemplo ASPP1) suprime la muerte celular programada inducida por estaurosporina en líneas celulares animales (por ejemplo, humanas).

Los vectores de expresión recombinantes, que codifican moléculas de interferón, están contruidos basándose en el diseño de la molécula de interferón sintética descrita en el ejemplo 1, excepto que la parte A, la proteína NusA, se cambia a la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) y que el promotor es un promotor de mamífero constitutivo tal como la actina o el promotor de CMV. La secuencia de autoasociación para p53 es ILTIITLLE (que tiene una puntuación tango de 72) y esta secuencia está comprendida adicionalmente en la parte B del interferón sintético conduciendo a una molécula de interferón con una especificidad para p53. La secuencia de autoasociación para ASPP1 es MILTVFLSN (que tiene una puntuación tango de 63) y esta secuencia está comprendida adicionalmente en la parte B de molécula de interferón sintética que conduce a una molécula de interferón con una especificidad para ASPP1. Se cultivaron células HeLa y se transfectaron con los vectores recombinantes. La GFP (parte A) permite la visualización de las moléculas de interferón sobreexpresadas. La adición de estaurosporina 1 μM para células de control transfectadas y no transfectadas induce una respuesta apoptótica diferencial.

8. Interferencia de proteínas de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en pez cebra

Se desarrollaron moléculas de interferón que se dirigían a VEGF de pez cebra. Se puede seguir la inactivación específica (por agregación) del VEGF segregado por un trastorno del desarrollo vascular en embriones de pez cebra.

En una primera etapa se determinaron las regiones de autoasociación presentes en la proteína VEGF del pez cebra con el algoritmo TANGO. La región de agregación con la puntuación TANGO más alta es NH_2 -FLAALLHLSA-COOH. Basándose en esta secuencia de autoasociación se desarrollaron cuatro moléculas de interferón:

Interferón A: NH_2 -RLFLAALLRFLAALLHLSAR-COOH

Interferón B: NH_2 -RFLAALLHLSARLFLAALLR-COOH

Interferón C: NH_2 -RYLAILAGIRLFLAALLR-COOH

Interferón D: NH_2 -RYLAILAGIRFLAALLHLSAR-COOH

Interferón E (NH_2 -EALVVYLIQLAGR-COOH) sirvió como una secuencia de control y procede de una secuencia fuera de esta región TANGO alta.

Obsérvese que los interferones A, B y D comprenden la región TANGO completa mientras el interferón C comprende sólo una parte de la región TANGO. Las secuencias procedentes de las regiones TANGO están subrayadas.

Estas moléculas de interferón se añadieron al medio de embriones de pez cebra *Tg(fli1:EGFP)^{y1}* transgénicos a diferentes concentraciones. El pez cebra de *Tg(fli1:EGFP)^{y1}* transgénico expresa Proteína Fluorescente Verde aumentada (GFP) en sus células endoteliales, dichos peces se describen en Lawson ND y Weinstein BM (2.002) *Dev. Biol.* 248, 307-318), son proporcionados por el Centro de Recursos Internacionales del Pez Cebra (Universidad de Oregón) y se mantienen como se describe en el libro del pez cebra, una guía para el uso de laboratorio del pez

cebra (*Danio rerio*), Univ. Oregon Press, Eugene, 1.994).

Se exponen embriones descorionados durante 20 horas posfertilización (hpf) en placas de 24 pozos (10 embriones/pozo) y se expusieron a diversas concentraciones de las moléculas de interferón seleccionadas (empezando a 50 μ M) durante 24 horas. Se analizaron embriones vivos a las 28 y 48 hpf (horas posfertilización) usando formación de imágenes confocal que realizó usando un microscopio de barrido láser Zeiss LSM510.

Aunque controlando el desarrollo de diferentes estructuras vasculares, se presta particular atención a: (i) la estructura de la aorta dorsal (AD), vena cardinal posterior (PCV), (ii) la salida de los vasos intersomáticos (VIS) y la formación del plexo vascular (PV) en la región posterior del tronco. Un sumario de los experimentos dependientes de la dosis se muestra en la Tabla 1. Es evidente que los interferones A y C inducen claros defectos vasculares en las larvas de peces cebras que se desarrollan. Es sorprendente el hecho de que las moléculas de interferón se absorban por las larvas de pez cebras por la piel y que no sea necesaria la inyección de los interferones. Los interferones B y D requieren que se administren en concentraciones aún menores para poder controlar los defectos vasculares específicos.

9. Interferencia de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* de levadura

Se ha usado la eliminación de la enzima Ura3 de levadura para mostrar que la interferencia de proteínas actúa en eucariotas debido a que la inactivación fijada como diana (por agregación) de la proteína Ura3 proporciona una lectura fácil. La enzima Ura3 de *S. cerevisiae* es una enzima esencial implicada en la ruta de biosíntesis de uracilo. Por lo tanto, los mutantes de *S. cerevisiae* que carecen del gen URA3 no pueden crecer en medio sin uracilo pero se puede restablecer el crecimiento por adición de uracilo al medio. En una primera etapa, las regiones de autoasociación presentes en la proteína Ura3 se determinaron con el algoritmo TANGO. La región de autoasociación (o la región de agregación) con la mejor puntuación TANGO es NH₂-VIGFIAQ-COOH (puntuación TANGO: 74). Esta secuencia peptídica se usó para generar una construcción de expresión de interferón. Para clonar la secuencia de autoasociación que codifica este péptido en trama con la construcción de interferón sintético (véase el ejemplo 1) se usaron los siguientes dos oligonucleótidos:

agregador URA3 para: 5' CCTCTAGAATGAAAGAAATTTTGGCTGTAG 3' y

agregador URA3 Rev: 5' CCGTCGACTTA AGC TTG AGC AAT AAA GCC GAT AAC GCCAGCAGCGCCCGTTTAGCAGC 3'.

Los sitios de restricción *Xba*I y *Sal*I están subrayados. El codón de iniciación de la proteína NusA está destacado en negrita. El codón de detención se representa en cursiva y la secuencia que codifica los siete aminoácidos Ura3 se representa en negrita.

Como iniciador para el PCR se ha usado el plásmido pETM60 (regalo de G. Stier, EMBL) que contiene la proteína NusA acoplada a la construcción de interferón/ligador sintético (véase el ejemplo 1). Este vector contiene un promotor T7, confiere resistencia a la kanamicina y proporciona una etiqueta de expresión N-terminal de seis histidinas. El producto PCR resultante se subclonó en el vector pBEVY/GT (Miller CA 3, Martinat MA y Hyman LE (1.988) *Nucleic Acids Res.* 26: 3.577-3.583) usando los sitios de restricción *Xba*I y *Sal*I. En este vector la "secuencia de autoasociación NusA-interferón sintético-ligador-Ura3" - cassette de expresión estuvo bajo el control del promotor GAL1/10 *S. cerevisiae*. El marcador de selección de este vector es el gen *TRP1*.

Se introdujeron construcciones con secuencias verificadas con y sin el ADN codificando los siete aminoácidos Ura3 (procedentes de la región de autoasociación) en la cepa PVD2 de *S. cerevisiae* por transformación y la selección de transformantes se basó en complementación *trp1*. La cepa PVD2 procede de la cepa W303-1A (Thomas BJ y Rothstein R. (1.989) *Cell* 56, 619-630) pero la cepa PVD2 se transforma con alelos de cepa natural de ambas *HIS3* y *URA3*. La cepa PVD2 es aún auxotrófica para la leucina (*LEU2*), triptófano (*TRP1*) y adenina (*ADE2*). Los transformantes se seleccionaron en medio SDglu-Trp (medio mínimo de levadura con glucosa al 2% pero sin triptófano). Se volvieron a llevar las colonias a placas de SDglu-Trp frescas para colonias solas. Se cultivaron durante la noche dos colonias independientes en medio SDglu-Trp líquido. El OD₆₀₀ del cultivo se ajustó después a 1 y se marcaron 5 microlitros de una dilución en serie de 10 veces en SDglu-Ura-Trp (medio SD con glucosa al 2% pero sin uracilo y sin triptófano) o placas de SDgal-Ura-Trp (medio SD con galactosa al 2% pero sin uracilo y sin triptófano). El resultado de este experimento se muestra en la Fig. 2. Este experimento se ha repetido tres veces con resultados similares. La expresión del vector pBEVY/GT vacío o el vector que expresa sólo la construcción de NusA-interferón sintético (sin una secuencia de autoasociación de ura3) no muestra ninguna inhibición de crecimiento o medio sin uracilo. La expresión de la construcción de la región de autoasociación NusA-interferón sintético-Ura3, sin embargo, inhibe fuertemente el crecimiento en el medio sin uracilo (cuando se añade uracilo al medio de crecimiento no hay defecto de crecimiento), mostrando que la proteína Ura3 endógena está inactivada específicamente por interferencia de proteínas.

10. Interferencia de proteínas en *Candida albicans* de levadura

Candida albicans causa el 40% de las infecciones fúngicas en seres humanos. Este comensal posee una serie de factores de virulencia. Aparte de la capacidad para adherirse a toda clase de plásticos (un problema principal en unidades de cuidados intensivos) o la producción de lipasas y proteinasas, está la capacidad para adoptar diversas morfologías que se han estudiado lo más extensamente debido a que es uno de los factores de virulencia principales. Muchos factores de transcripción pueden inducir la transición de células de tipo levadura a hifas o pseudohifas. Se requieren otros factores de transcripción para mantener las células en la forma de tipo levadura. Un ejemplo de tal represor de formación de hifas es Tup1. Como ejemplo de interferencia de proteínas en *Candida albicans* se ha usado la proteína Tup1 como una diana. La regulación por disminución de la función biológica de Tup1 debería inducir la formación de hifas. En una primera etapa las regiones de autoasociación presentes en la proteína Tup1 se determinaron con el algoritmo TANGO. La región de autoasociación (o la región de agregación) con la mejor puntuación TANGO (puntuación TANGO: 30) es NH₂-VISVAVSL-COOH. Este péptido se usó para generar una construcción de expresión de interferón. Para clonar la secuencia de autoasociación que codifica este péptido en trama con la construcción de interferón sintético del ejemplo 1, se usaron los siguientes dos oligonucleótidos:

agregador TUP1 para:

5'ATTGTACAATATCCGTATGTGCCTGACTACGCAATGGCTCAGTGGCAGAAC 3' y

agregador TUP1 Rev:

5'GCGCTAGCTTA AGC TAG GGA TAC AGC GAC TGA GAT GAC GCCAGCAGCGCCCGGTTTA 3'.

Los sitios BsrGI y *NheI* están subrayados. El codón de interrupción se representa en cursiva y el péptido diana que codifica la secuencia inversa se representa en negrita.

Se usa el plásmido pETM60 que contiene la construcción NusA-interferón sintético (del ejemplo 1) como un iniciador para el PCR. El producto PCR resultante se subclonó en el plásmido pPCK1-GFP (Barelle CJ, Manson CL, MacCallum DM, Odds F, Gow NAR, Brown AJP. *Yeast* 21: 333-340, 2.004) usando los sitios de restricción BsrGI y *NheI*. En este vector la construcción de interferón se clonó en trama con el gen GFP presente en el vector y la cassette de expresión de interferón resultante "GFP-interferón sintético-ligador-" región de autoasociación Tup1" está bajo el control del promotor *PCK1*. En la última construcción se reemplaza proteína fluorescente verde (GFP) por NusA y GFP sirve como parte A de la molécula de interferón. El promotor *PCK1* es fuertemente inducido en medio que contiene casaminoácidos y se reprime en medio que contiene glucosa (Leuker CE, Sonneborn A, Delbruck S, Ernst JF. *Gene* 192: 235-240, 1.997). Después se transforman los plásmidos de secuencias verificadas en la cepa CAI4 de *C. albicans* (Fonzi WA, Irwin MY. *Genetics* 134: 717-728, 1.993). Se seleccionaron transformantes en SDglu-ura (medio mínimo de levadura que comprende 2% de glucosa pero sin uracilo). Los transformantes fueron cultivados durante la noche en medio mínimo que contenía glucosa, se diluyeron las células para obtener aproximadamente 20 células/100 microlitros y se puso en placas este volumen en placas de agar de SDglu-ura o SDcasaminoácido-ura. Se puntuó la morfología de la colonia después de 4 y 6 días de crecimiento (véase la Fig. 3). Como se puede ver en la Fig. 3, la regulación por disminución de Tup1 tiene lugar en medio con casaminoácidos y la formación de hifas es claramente visible en el borde de las colonias. No se ve formación de hifas en los transformantes de control ((plásmido pPCK1-GFP sin cassette de expresión de interferón)) ni en el medio que comprende glucosa. El ejemplo muestra que el Tup1 endógeno está inactivado de manera específica por interferencia de proteínas.

11. Aplicación de interferencia de proteínas en plantas

Se demuestra interferencia de proteínas en células BY2 de tabaco usando células BY2 ya transformadas con diversos genes de fusión GFP (dichos genes se representan en la Tabla 2). Una lista de dichos genes *Arabidopsis thaliana* junto con sus correspondientes regiones de autoasociación identificadas y las puntuaciones tango se representan en la tabla 2.

Las moléculas de interferón específicas frente a cada una de las dianas de la tabla 2 se designan basándose en la molécula de interferón sintética descrita en el ejemplo 1, excepto que la proteína NusA se cambia por la Proteína Fluorescente Roja (PFR) y que la parte B comprende adicionalmente las regiones de autoasociación específicas de las dianas representadas en la tabla 2.

Se introducen construcciones que codifican dichas moléculas de interferón específicas en vectores apropiados para sobreexpresión usando la tecnología Gateway™ (Invitrogen Life Technologies). Con este fin, se desarrolló una serie de vectores binarios compatibles Gateway para transformación de la planta. Para sobre-expresión se usa el vector pK7WGD2 en que se pone el gen bajo el control del promotor de p35S. Para transformaciones de células de plantas se aplica el sistema de vector ternario. El plásmido pBBR1MCS-5.virGN54D se usa como un vector ternario. El

plásmido binario se introduce en cepa LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* soportando ya el plásmido ternario por electro-transformación. Se establece cultivo BY-2 fresco antes de la transformación con la construcción particular. Se inocula BY-2 de cinco días 1:10 y creció durante tres días (28°C, 130 rpm, oscuridad). El cultivo líquido de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con pK7WGD2-GUS (vector de control), pK7WGD2-interferón 1 (por ejemplo específico para aurora 1, pK7WGD2-interferón 2 (por ejemplo específico para aurora 2) etc. etc. se establece dos días antes de la transformación de BY-2. Un asa de Henle de bacterias del medio sólido se inocula en 5 ml de medio LB líquido con los antibióticos (rifampicina, gentamicina, estreptomina y espectinomicina). Se cultiva el cultivo durante dos días (28°C, 14 rad/s (130 rpm)). La transformación de BY-2 se realiza en caja de petri vacía (Ø 4,6 cm) con el método de cocultivo. Se pipeteó BY-2 (3 ml) de tres días en placa y se añadieron 50 ó 200 µl de suspensión bacteriana. Se agitaron las placas con cuidado y se dejó reposar en la mesa de trabajo manual laminar en la oscuridad durante tres días. Después de cocultivo se ponen en placas las células en el medio sólido BY-2 con las selecciones (50 µg/ml de kanamicina y 500 µg/ml de vancomicina y 500 µg/ml de carbenicilina para matar el exceso de bacterias). Se sellaron las placas con tapa Milipore y se incubaron a 28°C en la oscuridad durante aproximadamente dos semanas después de lo cual se hace visible el callo de células. La eficacia de la interferencia de proteínas (en la presente memoria la agregación entre la construcción GFP y la construcción PFR) se visualiza comprobando la expresión de GFP, PFR y la co-localización de GFP y PFR bajo el microscopio de fluorescencia.

Material y métodos referentes a los ejemplos 1 y 2.

20 Construcciones, células y medios

Se clonaron las moléculas de interferón en el vector pETM60 (regalo de G. Stier, EMBL). Este vector está bajo control de T7 ARN polimerasa (la T7 ARN polimerasa está bajo el control de elementos reguladores del operón lac de *E. coli*), confiere resistencia a la kanamicina y proporciona una etiqueta de expresión N-terminal de seis histidinas seguido por NusA. Una serie de oligos de solapamiento que codifica la secuencia de la parte B de interferón se usó para crear un 'gen sintético' por PCR. Este gen se ligó a pETM60 vía los sitios de restricción Nco1 y BamH1. Se crearon genes de interferón por PCR de la parte B del interferón, usando un oligo anticodificación, largo, para incluir la secuencia para el ligador flexible y la región de autoasociación específica de la proteína (el cebo) en el C final. Estos se ligaron a pETM60 vía los sitios de restricción Nco1 y BamH1. Todos los oligos se adquirieron de Sigma-Genosys, todas las enzimas de restricción de Fermentas y se realizaron ligaduras usando el Estuche de Ligadura Quick de Roche.

Se produjeron células BL21 (DE3) competentes de manera química internamente y se transformaron siguiendo protocolos estándar. Se prepararon placas de agar LB estándar y todas las placas de agar contuvieron 50 µg/ml de kanamicina. Se prepararon placas completas de M9 complementando con medio M9 estándar con los 20 aminoácidos (50 µg/ml) y los nucleótidos adenina; guanina, uracilo y xantina (20 µg/ml). Las placas seleccionadas M9 fueron idénticas a M9 completas en todos los aminoácidos menos uno. Para controlar la posible degradación de aminoácidos en el almacenamiento, se prepararon placas un día antes de uso. Se preparó LB siguiendo protocolos estándar y se incluyó kanamicina a 50 µg/ml. Todos los aminoácidos se adquirieron de Sigma, kanamicina e IPTG de Duchefa.

40 Protocolos

Se transformaron células BL21 (DE3) con las construcciones de expresión, se pusieron en placas en agar – LB más kanamicina y se incubaron a 37°C durante la noche. Se usó una sola colonia para inocular 10 ml de LB más kanamicina y esto se cultivó durante la noche a 37°C, agitando. Al día siguiente este cultivo se usó para inocular 10 ml de LB más kanamicina 1:100 y esto se cultivó hasta que se obtuvo un OD600 de 0,6. Después se dividieron los cultivos en dos; se añadió IPTG (50 µM) a un cultivo para inducir expresión de interferón y además se incubaron ambos cultivos a 37°C durante el tiempo de expresión deseado. Después se recogieron las células por centrifugación y se lavaron dos veces (por resuspensión y centrifugación) con disolución de sal (NaCl al 0,85% p/v). Después se resuspendieron las células en disolución de sal para proporcionar un OD600 final de 0,05 y se pusieron en placas 200 µl de esta suspensión de células en placas de agar. Se incubaron las placas de agar a 37°C durante la noche y se observó crecimiento de colonias al día siguiente. En el caso de que fuera necesario, se recogen las colonias con un palillo estéril en placas de agar frescas.

55

TABLAS

| embriones de 48 hpf con el fenotipo vascular indicado | | | | | | | |
|---|--------|---------------------------------|----------------------|-------------|----------------------|------------|--------------------------------|
| Interferón | Conc. | % de embriones afectados | Aorta Dorsal Delgada | PCV Anormal | Retraso en brote VIS | VP Anormal | Número de embriones analizados |
| E | 50 µM | - | - | - | - | - | 10 |
| A | 2,5 µM | 80% | 20% | 40% | 20% | 20% | 10 |
| B | 1 µM | la mayoría de embriones muertos | | | | | 10 |
| C | 2 µM | 80% | 20% | 20% | 20% | 20% | 10 |
| D | 2,5 µM | la mayoría de embriones muertos | | | | | 10 |

5 Tabla 1: Sumario de los efectos dosis-respuesta de diferentes moléculas de interferón VEGF (usadas en el ejemplo 8) en vasculatura de pez cebra

| | Gen | Puntuación Tango | Región de autoasociación |
|----|-----------|------------------|--------------------------|
| | AtFH5 | 95,7956 | VFWLILFSGLLVITL |
| 10 | AtFH5 | 75,3155 | IIIAVVVTAVSTFLLAALFFLC |
| | AtFH6 | 80,8913 | FFFFYIFFSVSVSS |
| | AtFH6 | 64,3993 | AIVISVGIVTLGMLSALAFFLY |
| | AtMAP65-3 | 55,9959 | QFIVVM |
| | AURORA1 | 51,1964 | YLILEYAA |
| 15 | AURORA1 | 19,4128 | YGYFY |
| | AURORA2 | 35,8169 | VYLILEYAVRG |
| | AURORA2 | 20,1483 | YGYFY |
| | AURORA3 | 78,0306 | IFLIL |
| | AURORA3 | 16,6145 | FGWF |
| 20 | TPLATE | 73,2511 | SIAILTLW |
| | TPLATE | 20,4469 | GFWWQVLYYPPF |
| | TPLATE | 16,3765 | IWTIA |

Tabla 2: proteínas procedentes de *Arabidopsis thaliana*, regiones de autoasociación identificadas y correspondientes puntuaciones tango

Referencias

1. Dobson, C. M. Protein-misfolding diseases: Getting out of shape. *Nature* 418, 729-730 (2.002).
- 5 2. Dobson, C. M. Principles of proteína folding, misfolding y aggregation. *Semin Cell Dev Biol* 15, 3-16(2004).
3. Nelson, R. et al. Structure of the cross-beta spine of amiloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-8 (2.005).
- 10 4. Makin, O. S., Atkins, E., Sikorski, P., Johansson, J. & Serpell, L. C. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 315-20 (2.005).
- 5 5. Hamada, D., Yanagihara, I. & Tsumoto, K. Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotechnol* 22, 93-7 (2.004).
- 15 6. Fernandez-Escamilla, A. M., Rouseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* 22, 1.302-6 (2.004).
- 20 7. Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G. & Dobson, C. M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* 424, 805-8 (2.003).
- 25 8. Pawar, A. P. et al. Prediction of "aggregation -prone" and "aggregation -susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* 350, 379-92 (2.005).
9. Lopez de la Paz, M. & Serrano, L. Sequence determinants of amiloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 87-92 (2.004).
- 30 10. Linding, R., Schymkowitz, J., Rouseau, F., Diella, F. & Serrano, L. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol* 342, 345-53 (2.004).
- 35 11. Clark, L. A. Protein aggregation determinants from a simplified model: cooperative folders resist aggregation. *Protein Sci* 14, 653-62 (2.005).
12. Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G. & Hartl, F. U. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* 15, 17-29 (2.004).
- 40 13. De Marco, V., Stier, G., Blandin, S. & de Marco, A. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 766-71 (2.004).
14. Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C, Lottspeich, F. & Hartl, F. U. Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* 402, 147-54 (1.999).
15. Bairoch, A. et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 33, D154-9 (2.005).
- 45 16. Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res* 32, D230-4 (2.004).
17. Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2.714-2.723 (1.997).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula que no se encuentra en la naturaleza capaz de regular por disminución la función de una proteína, que comprende al menos una región de agregación- β expuesta al entorno y procedente de dicha proteína que se tiene que regular por disminución, en la que dicha región de agregación- β se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de agregación- β , para uso como un medicamento, en el que dicha molécula se puede obtener proporcionando:
- parte A que comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico, proteína o perla de agarosa que evita la agregación de la parte B y
 - parte B que comprende al menos 1 región de agregación- β y en la que dicha región procede de dicha proteína que se tiene que regular por disminución.
2. La molécula para uso según la reivindicación 1, en la que dicho resto es un péptido, un dominio proteico o una perla de agarosa.
3. La molécula para uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha región de agregación- β consiste en al menos 5 aminoácidos contiguos.
4. La molécula para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que un ligador está presente entre dicha región de agregación- β y dicho resto.
5. La molécula para uso según la reivindicación 4, en la que dicho ligador es un polipéptido o es de naturaleza no polipeptídica.
6. La molécula para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha molécula es un polipéptido y está codificada por una secuencia de nucleótidos presente en un vector recombinante y que, en la transformación a una célula u organismo, produce dicho polipéptido en dicha célula u organismo.
7. La molécula para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de cáncer.
8. La molécula para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de infección con un patógeno.
9. Una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de agregación- β aislada de un dominio proteico capaz de ser soluble en agua en el que dicha región de agregación- β está expuesta al entorno y fusionada a un resto que evita la agregación de dicha región de agregación-beta, en la que dicha molécula se puede obtener proporcionando:
- parte A que comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico, proteína o perla de agarosa que evita la agregación de parte B y
 - parte B que comprende al menos 1 región de agregación- β y en la que dicha región procede de una proteína con cuya función se tiene que interferir.
10. Una molécula según la reivindicación 9, en la que dicho resto es un péptido, un dominio proteico o una perla de agarosa.
11. Una molécula según la reivindicación 9 ó 10, en la que la región de agregación- β y el resto que evita la agregación son de otra proteína o son de la misma proteína pero no inmediatamente adyacentes en esa proteína.
12. Un vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
13. Una molécula o vector según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para uso como medicamento.
14. Un método para aislar una proteína de una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con una molécula que comprende al menos una región de agregación- β expuesta al entorno y aislada de dicha proteína, en el que dicha región de agregación- β se fusiona a un resto que evita la agregación de dicha región de agregación- β y aislar el complejo molécula co-agregada-proteína resultante de dicha muestra, en el que dicha molécula se puede obtener proporcionando:
- parte A que comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico, proteína o perla de agarosa que evita la agregación de parte B y

- parte B que comprende al menos 1 región de agregación- β y en la que dicha región procede de dicha proteína que se tiene que aislar.

5 15. Un método según la reivindicación 14, en el que dicho resto es un péptido, un dominio proteico o una perla de agarosa.

16. Un método según la reivindicación 14 ó 15, que comprende además la detección de una proteína en dicha muestra.

10 17. Un método para la regulación por disminución de la función biológica de una proteína que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula que no se encuentra en la naturaleza que comprende al menos una región de agregación- β expuesta al entorno, presente en dicha proteína y fusionada a un resto que evita la agregación de dicha región de agregación-beta, en el que el método no se realiza en seres humanos o animales, en el que dicha molécula se puede obtener proporcionando:

15 - parte A que comprende una región, tal como un péptido, dominio proteico, proteína o perla de agarosa que evita la agregación de parte B y

20 - parte B que comprende al menos 1 región de agregación- β y en la que dicha región procede de dicha proteína que se tiene que regular por disminución.

Figura 1

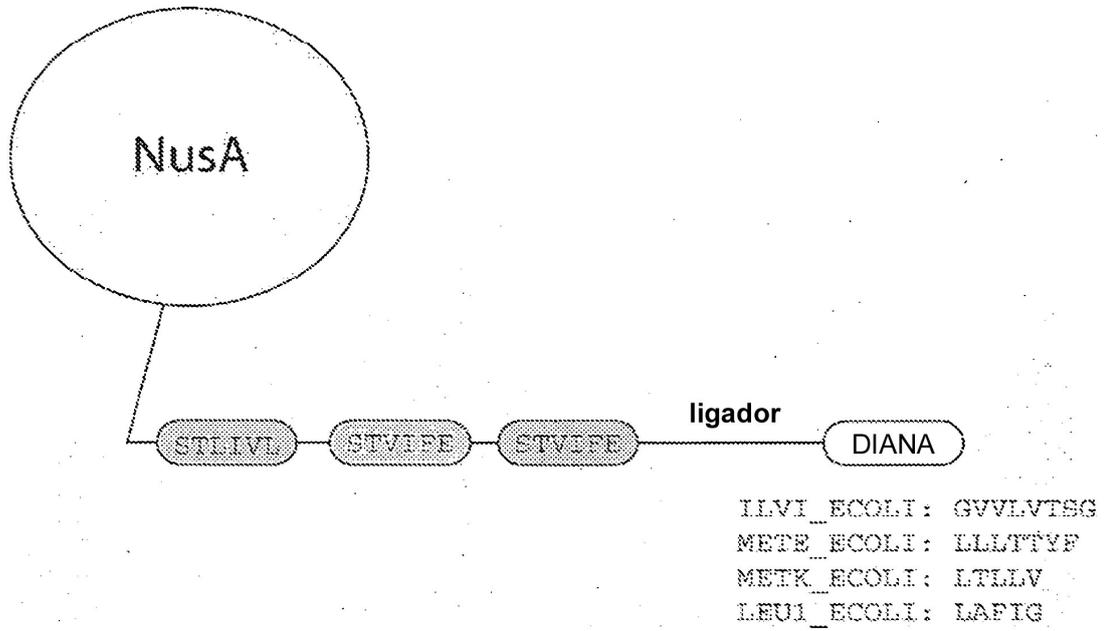


Figura 2

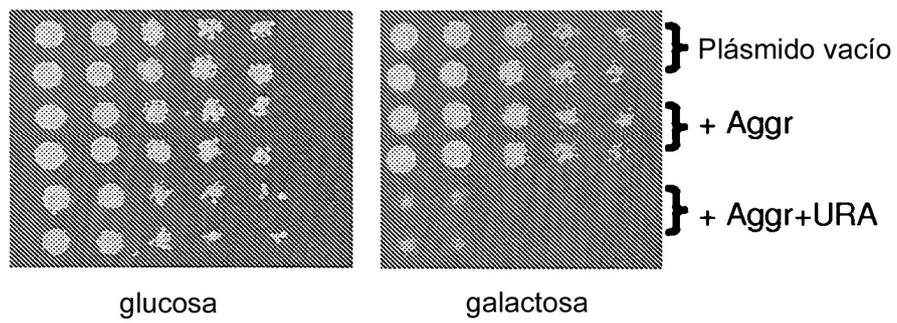


Figura 3

