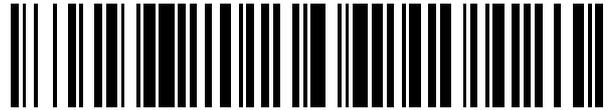


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 963**

51 Int. Cl.:

A61K 38/01 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2009 E 13002793 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2650008**

54 Título: **Utilización de inhibidores peptídicos permeables celulares de la vía de transducción de señales JNK para el tratamiento de enfermedades cancerosas**

30 Prioridad:

30.05.2008 WO PCT/EP2008/004341

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

23.03.2015

73 Titular/es:

**XIGEN INFLAMMATION LTD. (100.0%)
Arch. Makariou III, 195 Neocleous House
3030 Limassol, CY**

72 Inventor/es:

BONNY, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 531 963 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

Utilización de inhibidores peptídicos permeables celulares de la vía de transducción de señales JNK para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

5 La presente invención se refiere a la utilización de inhibidores de proteína quinasa y más específicamente al uso de inhibidores de la proteína quinasa amino terminal c-Jun, de secuencias inhibitoras de JNK, de péptidos quiméricos o composiciones farmacéuticas que los contienen, para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos altamente relacionados con la señalización de JNK, seleccionándose dichas enfermedades o trastornos de entre enfermedades cancerosas.

10 La quinasa amino terminal c-Jun (JNK) es un miembro del grupo activado por estrés de las proteína quinasas activadas por mitógeno (MAP). Estas quinasas están implicadas en el control del crecimiento y la diferenciación celular y, en general, en la respuesta celular a estímulos ambientales. La vía de transducción de las señales JNK es activada en respuesta al estrés ambiental y por la unión de varias clases de receptores de la superficie celular. Estos receptores pueden incluir receptores citoquina, receptores serpentina y tirosinquinasa receptoras. En las células de mamífero, la JNK está implicada en procesos biológicos como la transformación oncogénica y en respuestas mediadoras de adaptación al estrés ambiental. La JNK también se asocia a la respuesta inmunomoduladora, incluyendo a la maduración y diferenciación de células inmunitarias, además para llevar a cabo la muerte celular programada en aquellas células identificadas para su destrucción por el sistema inmunitario. Esta propiedad excepcional convierte a la señalización JNK en un objetivo prometedor para desarrollar una intervención farmacológica. Entre otros trastornos neurológicos, la señalización de JNK está particularmente implicada en la apoplejía isquémica y en la enfermedad de Parkinson, pero también en otras enfermedades que se mencionarán a continuación. Además, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38alfa se ha demostrado que regula negativamente la proliferación celular mediante la antagonización de la vía JNK-cJun. Por tanto, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38alfa parece ser activa en la supresión de la proliferación de células normales y cancerosas y, además se ha demostrado la implicación de JNK en enfermedades cancerosas (ver por ejemplo, Hui y col., Nature Genetics, Vol 39, No. 6, Junio 2007). También se ha demostrado que la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) está involucrada en el dolor neuropático producido por ligación del nervio espinal (SNL), donde la SNL induce una activación lenta y persistente de JNK, en particular JNK1, mientras que la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 se halló en microglíocitos espinales después de la SNL, cayendo a un nivel casi basal a los 21 días (Zhuang y col., The Journal of Neuroscience, 29 de marzo de 2006, 26(13): 3551-3560).

30 Así, la inhibición o interrupción de la vía de señalización JNK, particularmente la provisión de inhibidores de la vía de señalización JNK, parece una potencial vía para combatir trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK. Sin embargo, actualmente sólo se conocen unos pocos inhibidores de la vía de señalización JNK.

35 Como es sabido de la técnica anterior, los inhibidores de la vía de señalización JNK incluyen particularmente, por ejemplo, inhibidores quinasa aguas arriba (por ejemplo, CEP-1347), inhibidores químicos pequeños de JNK (SP600125 y AS601245), que afectan directamente a la actividad quinasa, por ejemplo compitiendo con el sitio de adhesión ATP de la proteína quinasa, e inhibidores de péptidos de la interacción entre JNK y sus sustratos (D-JNK1 e I-JIP) (ver por ejemplo Kuan y col., Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders, febrero 2005, vol. 4, no. 1, pp. 63-67(5)).

40 El inhibidor de quinasa aguas arriba CEP-1347 (KT7515) es un inhibidor semi-sintético de la familia quinasa de linaje mixto. CEP-1347 (KT7515) promueve la supervivencia neuronal en dosis que inhiben la activación de las quinasas amino-terminales c-Jun (JNKs) en cultivos embrionarios primarios y células PC12 diferenciadas después de retirada trófica y en ratones tratados con 1-metil-4-feniltetrahidropiridina. Además, CEP-1347 (KT7515) puede promover la supervivencia a largo plazo de neuronas motoras y ciliares del ganglio simpático de la espina dorsal embrionaria del pollo (ver, por ejemplo, Borasioy col., Neuroreport, 9(7): 1435-1439, 11 de Mayo de 1998).

45 El inhibidor químico pequeño JNK SP600125 demostró reducir los niveles de fosforilación de c-Jun para proteger las neuronas dopaminérgicas contra la apoptosis y para restaurar parcialmente el nivel de dopamina en PD inducido por MPTP en ratones C57BL/6N (Wang y col., Neurosci Res. 2004 Feb; 48(2); 195-202). Estos resultados indican además que la vía JNK es el mediador principal de los efectos neurotóxicos de MPTP *in vivo* y que la inhibición de la actividad de JNK puede representar una estrategia nueva y eficaz para tratar el parkinson.

50 Otro ejemplo de inhibidores químicos pequeños es el inhibidor JNK AS601245 arriba mencionado. El AS601245 inhibe la vía de señalización JNK y promueve la supervivencia celular después de isquemia cerebral. *In vivo*, AS601245 proporcionó protección significativa contra la pérdida tardía de neuronas CA1 del hipocampo en un modelo de jerbo con isquemia global transitoria. Este efecto es mediado por la inhibición de JNK y, por tanto, por la expresión y fosforilación de c-Jun (ver por ejemplo Carboni y col., J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jul; 310(1):25-32. Epub 26 de febrero de 2004).

Una tercera clase de inhibidores de la vía de señalización JNK es la representada por los inhibidores peptídicos de la interacción entre JNK y sus sustratos, tal como se ha mencionado anteriormente. Como punto de partida para la

construcción de dichos péptidos inhibidores JNK, puede emplearse una alineación de secuencias de la proteína JNK natural. Típicamente estas proteínas comprenden dominios de JNK (JBDs) y ocurren en varias proteínas de adhesión a insulina (IB) tales como IB1 o IB2. El resultado de dicha alineación de secuencia ilustrativa es, por ejemplo, una alineación de secuencia entre los dominios de adhesión JNQ de IB1 [SEC ID NO: 13], IB2 [SEC ID NO: 14], c-Jun [SEC ID NO: 15] y ATF2 [SEC ID NO: 16] (ver las FIG. 1A-1C). Dicha alineación revela una secuencia de ocho aminoácidos parcialmente conservada (ver por ejemplo FIG. 1A). Una comparación de los JBDs de IB1 e IB2 revela además dos bloques de siete y tres aminoácidos altamente conservados entre las dos secuencias.

Secuencias construidas en base a dicha alineación se han descrito por ejemplo en WO 01/27268 o WO 2007/031280. WO 2007/031280 y WO 01/27268 describen péptidos de fusión permeables de células pequeñas, que comprenden la secuencia de permeabilidad celular denominada TAT, derivada de la secuencia básica de tráfico de la proteína HIV-TAT, y una secuencia inhibidora mínima de 20 aminoácidos de IB1. Ambos componentes están unidos covalentemente uno al otro. Ejemplos (actualmente el único) de inhibidores de la vía de señalización MAPK-JNK descritos tanto en la WO 2007/031280 como en la WO 01/27268 son L-JNK11 (péptido inhibidor de JNK compuesto por aminoácidos-L) o los péptidos D-JNK11 resistentes a proteasa (péptido inhibidor de JNK compuesto por aminoácidos-D no naturales). Estos péptidos inhibidores de JNK (JNKI) son específicos para JNK (JNK1, JNK2 y JNK3). En contraste con aquellos inhibidores de compuestos de células pequeñas que se discutieron anteriormente, las secuencias inhibidoras de WO 2007/031280 o WO 01/27268, por ejemplo JNK11, inhiben más bien la interacción entre JNK y su sustrato. Mediante esta secuencia de tráfico derivada de TAT, el péptido de fusión es transportado eficientemente a las células. Debido a las nuevas propiedades obtenidas por el componente de tráfico, los péptidos de fusión son transportados activamente a las células, donde mantienen sus efectos hasta la degradación proteolítica.

Sin embargo, los péptidos según WO 2007/031280 o WO 01/27268 demuestran ser activos sólo para un número de enfermedades particularmente limitado, en particular enfermedades proliferativas de células no malignas o proliferativas de células inmunológicamente relacionadas.

Así, un objeto de la presente invención consiste en identificar otras enfermedades que puedan combatirse con los péptidos inhibidores de JNK. Otro objeto de la presente invención es proporcionar (el uso de) péptidos inhibidores de JNK y derivados de los mismos para el tratamiento de dichas enfermedades, así como de enfermedades que todavía no son conocidas o son ya conocidas por su estrecha relación con la señalización de JNK.

Este objeto se resuelve mediante la utilización de una secuencia inhibidora de JNK tal como la definida aquí para la preparación de una composición farmacéutica para tratar diversas enfermedades estrechamente relacionadas con la señalización de JNK en un sujeto, seleccionándose las enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK en un sujeto de entre enfermedades cancerosas.

De acuerdo con una realización preferente, las enfermedades cancerosas se seleccionan de entre sarcoma de Kaposi, leucemia mieloide aguda, incluyendo eritroleucemia, melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas renales, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, carcinomas mamarios (= cáncer de mama), cáncer de útero, cáncer cervical, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, como papiloma, carcinomas inducidos por virus (por ejemplo carcinoma de cérvix = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por el virus del herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma EBV inducido por células B), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma acústico, carcinomas pulmonares (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma rectal, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebral, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer testicular, carcinoma de tiroides, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumores de la pituitaria, micosis fungoides, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma corpus, cáncer de huesos, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulval, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinoma de ovario, tumores de tejidos blandos, cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma pancreático (= cáncer pancreático), carcinoma del endometrio, metástasis hepáticas, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de la vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumores del páncreo, cáncer de próstata (= tumores prostáticos), etc., o de enfermedades infecciosas seleccionados de entre gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, leishmaniasis, ántrax y meningitis.

Debido a que las secuencias inhibidoras de JNK conocidas en la técnica sólo han demostrado ser útiles en una cantidad limitada de enfermedades, resulta sorprendente que las secuencias inhibidoras de JNK aquí definidas puedan usarse y ser apropiadas para el tratamiento de enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK, tal como se mencionó anteriormente. Esto no era obvio ni se ha sugerido en la técnica anterior, a pesar de que las secuencias inhibidoras de JNK son de conocimiento general en la técnica.

De acuerdo con una realización particular, una secuencia inhibidora de JNK tal como se usa aquí típicamente une JNK y/o inhibe la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun o ATF2 (ver por ejemplo las SEC ID NO: 15 y 16, respectivamente) o Elk1.

5 La secuencia inhibidora de JNK según la invención consiste en la SEQ ID NO: 2. Otras secuencias inhibidoras de JNK como se describen aquí comprenden o consisten en al menos una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 1 a 4, 13 a 20 y 33 a 100, o un fragmento, derivado o variante de las mismas. Estas otras secuencias inhibidoras de JNK pueden contener 1, 2, 3, 4 o incluso más copias de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a 4, 13 a 20 y 33 a 100, o una variante, un fragmento o un derivado de las mismas. Si está presente en más de una copia, estas secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 a 4, 13 a 20 y 33 a 100, o sus variantes, fragmentos o derivados, pueden estar unidas directamente a otras sin una secuencia enlazante o mediante una secuencia enlazante que comprende de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5 aminoácidos. Preferentemente, los aminoácidos que forma la secuencia enlazante se seleccionan de entre los residuos de aminoácidos glicina o prolina. Estas secuencias de aminoácidos según las SEQ ID NO: 1 a 4, 13 a 20 y 33 a 100, o sus fragmentos, variantes o derivados, pueden estar separadas unas de otras mediante una bisagra de 2, 3 o más residuos de prolina.

La secuencia inhibidora de JNK como se reivindica está compuesta por aminoácidos D. Otras secuencias inhibidoras pueden estar compuestas por aminoácidos L, aminoácidos D o por una combinación de ambos. Las secuencias inhibidoras de JNK pueden comprender al menos 1 o incluso 2, o al menos 3, 4 o 5, o al menos 6, 7, 8 o 9 o al menos 10 o más aminoácidos D y/o L, donde los aminoácidos D y/o L pueden estar dispuestos en las secuencias inhibidoras de JNK como se usan aquí en bloque, no en bloque o de forma alternada.

Otras secuencias inhibidoras de JNK como se describen aquí pueden estar compuestas exclusivamente por aminoácidos L. Tales secuencias inhibidoras de JNK pueden comprender o consistir entonces en al menos una "secuencia inhibidora de JNK nativa" según la SEQ ID NO: 1 o 3. En este contexto, los términos "nativo" o "secuencia(s) inhibidora(s) de JNK nativa(s)" se refieren a secuencias inhibidoras de JNK no alteradas según cualquiera de SEQ ID NO: 1 o 3 compuesta enteramente por aminoácidos L.

Otras secuencias inhibidoras de JNK como se describen aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-X}_n^a\text{-RPTTLXLXXXXXXQD-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-IB genérica (s)) [SEQ ID NO: 3] y/o el dominio de unión de JNK (JBD) de IB1 $\text{XRPTTLXLXXXXXXQDS/TX}$ (L-IB (genérica)) [SEQ ID NO: 19]. En este contexto, cada X típicamente representa un residuo aminoácido, preferentemente seleccionado de entre cualquier residuo de aminoácido (nativo). X_n^a típicamente representa un residuo aminoácido, preferentemente seleccionado de cualquier residuo aminoácido excepto serina o treonina, donde n (el número de repeticiones de X) es 0 o 1. Además, cada X_n^b puede seleccionarse de cualquier residuo aminoácido, donde n (el número de repeticiones de X) es 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más, siempre que, si n (el número de repeticiones de X) es 0 para X_n^a , preferentemente X_n^b no comprende una serina o una treonina en su C-terminal, con el fin de evitar una serina o una treonina en esta posición. X_n^b puede representar un segmento contiguo de residuos peptídicos derivados de la SEQ ID NO: 1 o 3. X_n^a y X_n^b pueden representar tanto aminoácidos D como L. Una secuencia inhibidora de JNK como se describe aquí puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) seleccionada de entre el grupo que incluye el dominio de unión de JNK de IB1 $\text{DITYRPKRPTTLNLFQVPRSQD}$ (L-IB1) [SEQ ID NO: 17]. Otra secuencia inhibidora de JNK como se describe aquí además puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) $\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH}$ (L-IB1(s)) [SEQ ID NO: 1]. Otras secuencias inhibidoras de JNK como se describen aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) seleccionada del grupo que incluye el dominio de unión de JNK de IB1 $\text{L-IB1(s1) (NH}_2\text{-TLNLFQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 33); L-IB1 (s2) (NH}_2\text{-TTLNLFQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 34); L-IB1(s3) (NH}_2\text{-PTTLNLFQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 35); L-IB1 (s4) (NH}_2\text{-RPTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 36); L-IB1(s5) (NH}_2\text{-KRPTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 37); L-IB1(s6) (NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 38); L-IB1(s7) (NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 39); L-IB1(s8) (NH}_2\text{-LNLFPQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 40); L-IB1(s9) (NH}_2\text{-TLNLFQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 41); L-IB1 (s10) (NH}_2\text{-TTLNLFQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 42); L-IB1(s11) (NH}_2\text{-PTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 43); L-IB1(s12) (NH}_2\text{-RPTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 44); L-IB1(s13) (NH}_2\text{-KRPTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 45); L-IB1 (s14) (NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 46); L-IB1(s15) (NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 47); L-IB1(s16) (NH}_2\text{-LNLFPQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 48); L-IB1(s17) (NH}_2\text{-LNLFPQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 49); L-IB1 (s18) (NH}_2\text{-TLNLFQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 50); L-IB1(s19) (NH}_2\text{-TTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 51); L-IB1(s20) (NH}_2\text{-PTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 52); L-IB1(s21) ((NH}_2\text{-RPTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 53); L-IB1(s22) (NH}_2\text{-KRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 54); L-IB1(s23) (NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 55); L-IB1(s24) (NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 56); L-IB1(s25) (NH}_2\text{-LFPQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 57); L-IB1(s26) (NH}_2\text{-LNLFPQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 58); L-IB1(s27) (NH}_2\text{-LNLFPQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 59); L-IB1(s28) (NH}_2\text{-TLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 60); L-IB1(s29) (NH}_2\text{-TTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 61); L-IB1(s30) (NH}_2\text{-PTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 62); L-IB1(s31) (NH}_2\text{-RPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 63); L-IB1(s32) (NH}_2\text{-KRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 64); L-IB1(s33) (NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 65); and L-IB1(s34) (NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 66).$

Otra secuencia inhibidora de JNK como se describe aquí puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) seleccionada del grupo que comprende el dominio de unión de JNK (largo) (JBD) de IB1 PGTGCGDTPRKRPTTLNLFQVPRSQDT(IB1-long) [SEQ ID NO: 13], el dominio de unión de JNK (largo) de IB2 IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS(IB2-long) [SEQ ID NO: 14], el dominio de enlace de JNK de c-Jun GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKPH(c-Jun) [SEQ ID NO: 15], el dominio de enlace de JNK de ATF2 TNEDHLAVHKHKHEMTLKFPGPARNDSVIV (ATF2) [SEQ ID NO: 16] (véase por ejemplo la figura 1A-1C). En este contexto, una alineación reveló una secuencia de 8 aminoácidos parcialmente conservada (ver la figura 1A) y una posterior comparación de los JBD de IB1 y IB2 reveló dos bloques de siete y tres aminoácidos que estaban altamente conservados entre las dos secuencias.

Las secuencias inhibidoras de JNK como se reivindican aquí están compuestas exclusivamente por aminoácidos-D como se ha indicado anteriormente. Estas secuencias inhibidoras de JNK compuestas por aminoácidos-D son secuencias D-retro-inversas no nativas de secuencias inhibidoras de JNK nativas. El término "secuencia retro-inversa" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal donde la dirección de la secuencia está invertida, invirtiéndose la quiralidad de cada residuo aminoácido (ver por ejemplo Jameson y col., Nature, 368,744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693 (1994)). La ventaja de combinar enantiómeros-D y la síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida están intercambiadas, mientras que la posición de los grupos de la cadena lateral de cada carbono alfa está preservada.

Las secuencias retroinversas-D tal como se usan aquí y como se han definido anteriormente presentan muy diversas propiedades útiles. Por ejemplo, las secuencias retroinversas-D tal como se usan aquí entran en las células de forma tan eficiente como las secuencias de aminoácidos-L empleadas aquí, mientras que las secuencias retroinversas-D tal como se usan aquí son más estables que las correspondientes secuencias de aminoácidos-L.

Otras secuencias inhibidoras de JNK como se describen aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia retro-inversa D de acuerdo con la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-DQXXXXXXXXLXLTTPR-X}_n^a\text{-X}_n^b\text{-COOH}$ (D-IB1 genérica (s)) [SEQ ID NO: 4] y/o $\text{XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX}$ (D-IB (genérica)) [SEQ ID NO: 20]. X_n^a y X_n^b son como se han definido anteriormente (preferentemente representando aminoácidos), donde X_n^b preferentemente representa un segmento contiguo de residuos derivado de SEQ ID NO: 2 o 4. Otras secuencias inhibidoras de JNK como se describen aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia retro-inversa D de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio de unión de JNK (JBD) de IB1 TDQSRVQPFLNLTTTPRKPRYTD (D-IB1) [SEQ ID NO: 18]. La secuencia inhibidora de JNK como se reivindica aquí consiste en al menos una secuencia retro-inversa D de acuerdo con la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-DQSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$ (D-IB1(s)) [SEQ ID NO: 2]. Otras secuencias inhibidoras de JNK descritas pueden comprender o consistir en al menos una secuencia retro-inversa D de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio de unión (JBD) de IB1 D-IB1(s1) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 67); D-IB1(s2) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 68); D-IB1(s3) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 69); D-IB1 (s4) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 70); D-IB1(s5) ($\text{NH}_2\text{-SRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 71); D-IB1 (s6) ($\text{NH}_2\text{-QSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 72); D-IB1(s7) ($\text{NH}_2\text{-DQSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 73); D-IB1(s8) ($\text{NH}_2\text{-PFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 74); D-IB1(s9) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 75); D-IB1(s10) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 76); D-IB1(s11) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 77); D-IB1(s12) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 78); D-IB1 (s13) ($\text{NH}_2\text{-SRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 79); D-IB1(s14) ($\text{NH}_2\text{-QSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 80); D-IB1(s15) ($\text{NH}_2\text{-DQSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 81); D-IB1(s16) ($\text{NH}_2\text{-FLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 82); D-IB1(s17) ($\text{NH}_2\text{-PFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 83); D-IB1(s18) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 84); D-IB1(s19) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 85); D-IB1(s20) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 86); D-IB1(s21) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 87); D-IB1(s22) ($\text{NH}_2\text{-SRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 88); D-IB1(s23) ($\text{NH}_2\text{-QSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 89); D-IB1(s24) ($\text{NH}_2\text{-DQSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 90); D-IB1(s25) ($\text{NH}_2\text{-DQSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 91); D-IB1(s26) ($\text{NH}_2\text{-QSRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 92); D-IB1(s27) ($\text{NH}_2\text{-SRVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 93); D-IB1(s28) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 94); D-IB1(s29) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 95); D-IB1(s30) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 96); D-IB1(s31) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 97); D-IB1(s32) ($\text{NH}_2\text{-PFLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 98); D-IB1(s33) ($\text{NH}_2\text{-FLNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 99); y D-IB1(s34) ($\text{NH}_2\text{-LNLTTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID NO: 100).

Otras secuencias inhibidoras de JNK descritas se muestran en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1, 3, 4, 13-20 y 33-100). La tabla muestra el nombre de la secuencia inhibidora de JNK que se usa aquí, así como también el número identificador de secuencia, su longitud y la secuencia de aminoácidos. Además, la Tabla 1 muestra las secuencias así como sus fórmulas genéricas, por ejemplo para las SEC ID NO: 1, 2, 5, 6, 9 y 11 y SEC ID NO: 3, 4, 7, 8, 10 y 12, respectivamente. La Tabla 1 describe además las secuencias quiméricas SEC ID NO: 9-12 y 23-32 (ver a continuación), L-IB1 las secuencias SEC ID NO: 33 a 66 y las secuencias D-IB1 SEC ID NO: 67 a 100.

Tabla 1

NOMBRE PEPTIDO/ SEQ.	SEC ID NO	AA	SECUENCIA
L-IB1(s)	1	19	RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
D-IB1(s)	2	19	DQSRPVQPFNLTTPRKPR (NH ₂ -DQSRPVQPFNLTTPRKPR-COOH)
L-IB(genérico)(s)	3	19	NH ₂ -X _n ^b -X _n ^a -RPTTLX _n XXXXXXXXXQD-X _n ^b -COOH
D-IB(genérico) (s)	4	19	NH ₂ -X _n ^b -DQXXXXXXXXLXLTPR-X _n ^a -X _n ^b -COOH
L-TAT	5	10	GRKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
D-TAT	6	10	RRRQRRKKRG (NH ₂ -RRRQRRKKRG-COOH)
L-genérico-TAT (s)	7	11	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -COOH
D-genérico-TAT (s)	8	11	NH ₂ -X _n ^b -RRRQRRKKR-X _n ^b -COOH
L-TAT-IB1(s)	9	31	GRKKRRQRRRPPRPRKPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -GRKKRRQRRRPPRPRKPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB (genérico) (s)	10	29	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -X _n ^a -RPLX _n XXXXXXXXXQD-X _n ^b -COOH
D-TAT-IB1(s)	11	31	DQSRPVQPFNLTTPRKPRPPRRRQRRKKRG (NH ₂ -DQSRPVQPFNLTTPRKPRPPRRRQRRKKRG-COOH)
D-TAT-IB (genérico) (s)	12	29	NH ₂ -X _n ^b -DQXXXXXXXXLXLTPR-X _n ^a -X _n ^b -RRRQRRKKR-X _n ^b -COOH
IB1-largo	13	29	PGTGCGD TYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ - PGTGCGD TYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
IB2-largo	14	27	IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS (NH ₂ - IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS -COOH)
c-Jun	15	29	GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKPH (NH ₂ - GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKPH -COOH)
ATF2	16	29	TNEDHLAVHKHKHEMTLKFPGPARNDSVIV (NH ₂ - TNEDHLAVHKHKHEMTLKFPGPARNDSVIV -COOH)
L-IB1	17	23	DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ - DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
D-IB1	18	23	TDQSRPVQPFNLTTPRKPRYTD (NH ₂ - TDQSRPVQPFNLTTPRKPRYTD -COOH)
L-IB (genérico)	19	19	XRPTTLX _n XXXXXXXXXQDS/TX (NH ₂ - XRPTTLX _n XXXXXXXXXQDS/TX -COOH)
D-IB (genérico)	20	19	XS/TDQXXXXXXXXLXLTPRX (NH ₂ - XS/TDQXXXXXXXXLXLTPRX -COOH)
L-genérico-TAT	21	17	XXXXRKKRRQRRRXXXX (NH ₂ - XXXXRKKRRQRRRXXXX -COOH)
D-genérico-TAT	22	17	XXXXRRRQRRKKRXXXX (NH ₂ - XXXXRRRQRRKKRXXXX -COOH)
L-TAT-IB1	23	35	GRKKRRQRRRPPD TYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ - GRKKRRQRRRPPD TYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
L-TAT-IB (genérico)	24	42	XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXXRPTTLX _n XXXXXXXXXQDS/TX (NH ₂ - XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXXRPTTLX _n XXXXXXXXXQDS/TX - COOH)
D-TAT-IB1	25	35	TDQSRPVQPFNLTTPRKPRYTDPPRRRQRRKKRG (NH ₂ - TDQSRPVQPFNLTTPRKPRYTDPPRRRQRRKKRG -COOH)
D-TAT-IB (genérico)	26	42	XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX (NH ₂ - XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX - COOH)
L-TAT-IB1(s1)	27	30	RKKRRQRRRPPRPRKPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RKKRRQRRRPPRPRKPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB1(s2)	28	30	GRKKRRQRRRX _n ^c RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -GRKKRRQRRRX _n ^c RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB1(s3)	29	29	RKKRRQRRRX _n ^c RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RKKRRQRRRX _n ^c RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
D-TAT-IB1(s1)	30	30	DQSRPVQPFNLTTPRKPRPPRRRQRRKKR (NH ₂ -DQSRPVQPFNLTTPRKPRPPRRRQRRKKR-COOH)

ES 2 531 963 T3

D-TAT-IB1(s2)	31	30	DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRX _n ^c RRRQRRKKRG (NH ₂ -DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRX _n ^c RRRQRRKKRG-COOH)
D-TAT-IB1(s3)	32	29	DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRX _n ^c RRRQRRKKR (NH ₂ -DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRX _n ^c RRRQRRKKR-COOH)
L-IB1(s1)	33	13	TLNLFQVPRSQD (NH ₂ -TLNLFQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s2)	34	13	TTLNLFQVPRSQ (NH ₂ -TTLNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s3)	35	13	PTTLNLFQVPRS (NH ₂ -PTTLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s4)	36	13	RPTTLNLFQVPR (NH ₂ -RPTTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s5)	37	13	KRPTTLNLFQVP (NH ₂ -KRPTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s6)	38	13	PKRPTTLNLFQV (NH ₂ -PKRPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s7)	39	13	RPKRPTTLNLFQ (NH ₂ -RPKRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s8)	40	12	LNLFPQVPRSQD (NH ₂ -LNLFPQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s9)	41	12	TLNLFQVPRSQ (NH ₂ -TLNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s10)	42	12	TTLNLFQVPRS (NH ₂ -TTLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s11)	43	12	PTTLNLFQVPR (NH ₂ -PTTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s12)	44	12	RPTTLNLFQVP (NH ₂ -RPTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s13)	45	12	KRPTTLNLFQV (NH ₂ -KRPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s14)	46	12	PKRPTTLNLFQ (NH ₂ -PKRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s15)	47	12	RPKRPTTLNLF (NH ₂ -RPKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s16)	48	11	NLFPQVPRSQD (NH ₂ -NLFPQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s17)	49	11	LNLFPQVPRSQ (NH ₂ -LNLFPQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s18)	50	11	TLNLFQVPRS (NH ₂ -TLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s19)	51	11	TTLNLFQVPR (NH ₂ -TTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s20)	52	11	PTTLNLFQVP (NH ₂ -PTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s21)	53	11	RPTTLNLFQV (NH ₂ -RPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s22)	54	11	KRPTTLNLFQ (NH ₂ -KRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s23)	55	11	PKRPTTLNLF (NH ₂ -PKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s24)	56	11	RPKRPTTLNLF (NH ₂ -RPKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s25)	57	10	LFPQVPRSQD (NH ₂ -LFPQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s26)	58	10	NLFPQVPRSQ (NH ₂ -NLFPQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s27)	59	10	LNLFPQVPRS (NH ₂ -LNLFPQVPRS-COOH)
L-IB1(s28)	60	10	TLNLFQVPR (NH ₂ -TLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s29)	61	10	TTLNLFQVP (NH ₂ -TTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s30)	62	10	PTTLNLFQV (NH ₂ -PTTLNLFQV-COOH)

ES 2 531 963 T3

L-IB1(s31)	63	10	RPTTLNLFQ (NH ₂ -RPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s32)	64	10	KRPTTLNLF (NH ₂ -KRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s33)	65	10	PKRPTTLNLF (NH ₂ -PKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s34)	66	10	RPKRPTTLNL (NH ₂ -RPKRPTTLNL-COOH)
D-IB1(s1)	67	13	QPFLNLTTPRKPR (NH ₂ -QPFLNLTTPRKPR-COOH)
D-IB1(s2)	68	13	VQPFLNLTTPRK (NH ₂ -VQPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s3)	69	13	PVQPFLNLTTPRK (NH ₂ -PVQPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s4)	70	13	RPVQPFLNLTTPR (NH ₂ -RPVQPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1(s5)	71	13	SRPVQPFLNLTTP (NH ₂ -SRPVQPFLNLTTP-COOH)
D-IB1(s6)	72	13	QSRPVQPFLNLT (NH ₂ -QSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s7)	73	13	DQSRPVQPFLNLT (NH ₂ -DQSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s8)	74	12	PFLNLTTPRKPR (NH ₂ -PFLNLTTPRKPR-COOH)
D-IB1(s9)	75	12	QPFLNLTTPRK (NH ₂ -QPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s10)	76	12	VQPFLNLTTPRK (NH ₂ -VQPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s11)	77	12	PVQPFLNLTTPR (NH ₂ -PVQPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1(s12)	78	12	RPVQPFLNLTTP (NH ₂ -RPVQPFLNLTTP-COOH)
D-IB1(s13)	79	12	SRPVQPFLNLT (NH ₂ -SRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s14)	80	12	QSRPVQPFLNLT (NH ₂ -QSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s15)	81	12	DQSRPVQPFLNL (NH ₂ -DQSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s16)	82	11	FLNLTTPRKPR (NH ₂ -FLNLTTPRKPR-COOH)
D-IB1(s17)	83	11	PFLNLTTPRK (NH ₂ -PFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s18)	84	11	QPFLNLTTPRK (NH ₂ -QPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s19)	85	11	VQPFLNLTTPR (NH ₂ -VQPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1(s20)	86	11	PVQPFLNLTTP (NH ₂ -PVQPFLNLTTP-COOH)
D-IB1(s21)	87	11	RPVQPFLNLT (NH ₂ -RPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s22)	88	11	SRPVQPFLNLT (NH ₂ -SRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s23)	89	11	QSRPVQPFLNL (NH ₂ -QSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s24)	90	11	DQSRPVQPFLN (NH ₂ -DQSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1(s25)	91	10	DQSRPVQPFL (NH ₂ -DQSRPVQPFL-COOH)
D-IB1(s26)	92	10	QSRPVQPFLN (NH ₂ -QSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1(s27)	93	10	SRPVQPFLNL (NH ₂ -SRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s28)	94	10	RPVQPFLNLT (NH ₂ -RPVQPFLNLT-COOH)

D-IB1(s29)	95	10	PVQPFLNLTT (NH ₂ -PVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s30)	96	10	VQPFLNLTTP (NH ₂ -VQPFLNLTTP-COOH)
D-IB1(s31)	97	10	QPFLNLTPR (NH ₂ -QPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s32)	98	10	PFLNLTPRK (NH ₂ -PFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s33)	99	10	FLNLTPRK (NH ₂ -FLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s34)	100	10	LNLTPRKPR (NH ₂ -LNLTPRKPR-COOH)

Otras secuencias inhibitoras de JNK descritas comprenden o consisten en al menos una variante, fragmento y/o derivado de las secuencias de aminoácidos anteriormente definidas, nativas o no nativas, según la SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100. Estas variantes, fragmentos y/o derivados mantienen la actividad biológica de las secuencias inhibitoras de JNK arriba descritas, nativas o no nativas, como se describen aquí, en particular de las secuencias de aminoácidos nativas o no nativas según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, esto es la unión de JNK y/o inhiben la activación de al menos un factor de transcripción de JNK activado, por ejemplo c-Jun, ATF2 o Elk1. Su funcionalidad puede comprobarse mediante diversos ensayos, por ejemplo ensayos de unión de péptido a su molécula diana o por métodos biofísicos, como espectroscopía, modelado por ordenador, análisis estructural, etc. En particular, una secuencia inhibitora de JNK o sus variantes, fragmentos y/o derivados como se han definido arriba puede analizarse por análisis de hidrofiliidad (véase por ejemplo Hopp y Woods, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3824-3828), que puede emplearse para identificar las regiones hidrófilas e hidrófobas de los péptidos, así como ayudar en el diseño de sustratos para la manipulación experimental, por ejemplo en experimentos de unión, o para la unión de anticuerpos. También pueden realizarse análisis estructurales secundarios para identificar regiones de una secuencia inhibitora de JNK o de variantes, fragmentos y/o derivados de la misma como se usan aquí que asumen motivos estructurales específicos (véase por ejemplo Chou y Fasman, 1974, Biochem 13: 222-223). La manipulación, traducción, la predicción de estructuras secundarias, los perfiles hidrofílicos e hidrofóbicos, la predicción y dibujo del marco de lectura abierto y la determinación de secuencias homólogas puede realizarse usando programas de ordenador disponibles en la técnica. Otros métodos de análisis estructural que también pueden emplearse incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X (véase por ejemplo Engstrom, 1974. Biochem Exp Biol 11: 7-13), espectroscopía de masas y cromatografía de gases (ver por ejemplo METHODS IN PROTEIN SCIENCE, 1997, J. Wiley and Sons, New York, NY) y modelización por ordenador (ver por ejemplo Fletterick y Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, En: CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Otras secuencias inhibitoras de JNK descritas pueden comprender o consistir en al menos una variante de una secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100. Una "variante de una secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100" es típicamente una secuencia derivada de cualquiera de las secuencias según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, donde la variante comprende alteraciones de las secuencias de aminoácidos según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100. Estas alteraciones típicamente comprenden de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10 y en especial de 1 a 5 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, presentando la variante una identidad de secuencia con cualquier de las secuencias según SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100 de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o incluso un 99%.

Si las variantes de una secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100 como se definen arriba se obtienen por sustitución de aminoácidos específicos, preferentemente estas sustituciones comprenden sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden incluir residuos de aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades físico-químicas lo suficientemente similares, de forma que una sustitución entre miembros del grupo preservará la actividad biológica de la molécula (véase por ejemplo Grantham, R. (1974), Science 185, 862-864). Para el experto en la materia es evidente que los aminoácidos también se pueden insertar o eliminar de las secuencias arriba especificadas sin alterar su función, en particular si las inserciones y/o deleciones sólo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de veinte y, preferentemente, menos de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para la actividad funcional. Además, se evitarán las sustituciones en las variantes que conducen a treoninas adicionales en aquellas posiciones de los aminoácidos accesibles a una fosforilasa, especialmente una quinasa, con el fin de evitar la inactivación de la secuencia inhibitora de JNK como se usa aquí o del péptido quimérico como se usa aquí *in vivo* o *in vitro*.

En la Tabla 2 se muestran residuos de aminoácidos sinónimos, que están clasificados en los mismos grupos y que se intercambian típicamente mediante sustituciones de aminoácidos conservativas.

Tabla 2 Grupos de residuos aminoácidos sinónimos preferentes

Aminoácido	Residuo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, (Thr), Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, (Thr), Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, (Thr), Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Una forma específica de una variante de SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100 es un fragmento de la secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) según la SEQ ID NO: 1, 1-4, 13-20 y 33-100 que está típicamente alterado mediante al menos una delección en comparación con la SEQ ID NO 1-4, 13-20 y 33-100. Típicamente, un fragmento comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, con una longitud habitualmente suficiente para permitir el reconocimiento específico de un epítope de cualquiera de estas secuencias. El fragmento típicamente comprende 4 a 18, 4 a 15 o 4 a 10 aminoácidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, donde el límite inferior del rango puede ser de 4 o 5, 6, 7, 8,9 o 10. Los aminoácidos delecionados pueden estar en cualquier posición de las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, preferentemente en los terminales N- o C-.

Además, un fragmento de una secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) según la SEQ ID NO: 1-4,13-20 y 33-100, como se describe anteriormente, puede definirse como una secuencia que comparte una identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias según SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100 como se usan aquí de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o incluso un 99%.

Otras secuencias inhibitoras de JNK descritas pueden además comprender o consistir en al menos un derivado de una secuencia inhibitora de(nativa o no nativa) según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100 como se han definido anteriormente. En este contexto, un "derivado de una secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) según las SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100" es preferentemente una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias según SEQ ID NO: 1-4, 13-20 y 33-100, comprendiendo el derivado al menos un aminoácido L o D (formando aminoácidos no naturales), preferentemente, 1 a 20, en especial 1 a 10 y en particular 1 a 5 aminoácidos modificados L o D. Los derivados de variantes o de fragmentos también están dentro del alcance de la presente invención.

"Un aminoácido modificado" en este sentido puede ser cualquier aminoácido que está alterado, por ejemplo diferentes glicosilaciones en varios organismos, por fosforilación o por marcado específico de aminoácidos. Este marcador se selecciona entonces típicamente de entre el grupo que comprende:

- (i) marcadores radioactivos, es decir, de fosforilación radioactiva o marcado radioactivo con azúfre, hidrógeno, carbono, nitrógeno, etc.;
- (ii) tintes colorantes (por ejemplo, digoxigenina, etc.);
- (iii) grupos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, etc.);
- (iv) grupos quimioluminiscentes;
- (v) grupos para la inmovilización en fase sólida (por ejemplo, His-tag, biotina, strep-tag, flag-tag, anticuerpos, antígeno, etc.); y
- (vi) una combinación de dos o más de los marcadores mencionados en (i) a (v).

En este contexto, una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia que "comparte una identidad de secuencia" de al menos, por ejemplo, un 95% con una determinada secuencia significa que la secuencia relevante de aminoácidos es idéntica a dicha secuencia determinada excepto en que puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia relevante. En otras palabras, para obtener una secuencia de aminoácidos que tenga una secuencia con una identidad de secuencia respecto a una secuencia determinada de al menos el 95% con una secuencia relevante, hasta el 5% (5 de 100) de los residuos aminoácidos de la secuencia relevante pueden insertarse o sustituirse por otros aminoácidos o eliminarse.

Para secuencias sin una correspondencia exacta, puede determinarse un "% de identidad" de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia. En general, estas dos secuencias a comparar se alinean para obtener la máxima correlación entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o en ambas secuencias para proporcionar el grado de alineamiento. Entonces puede determinarse un % de identidad sobre la longitud total de cada una de las secuencias a comparar (denominado también alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de longitudes definidas iguales o similares, o incluso más cortas (también llamado alineamiento local), más adecuado para secuencias de diferentes longitudes.

En la técnica son bien conocidos los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias, en particular tal como se usan aquí. Así, por ejemplo, se pueden emplear los programas disponibles de Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux y col., 1984, Nucleic Acids Res. 12, 387-395.), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman ((1981), J. Mol. Biol. 147, 195-197) y localiza la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. Se conocen en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410), accesible en la página de la NCBI en la red (ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63-98; Pearson y Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 85, 2444-2448).

Una secuencia inhibidora de JNK tal como se usa de acuerdo con la presente invención y como se ha definido anteriormente puede obtenerse o producirse por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por síntesis química, tal como se discute a continuación. Por ejemplo, puede sintetizarse un péptido que corresponde a una parte de una secuencia inhibidora de JNK tal como se usa aquí que incluye una región deseada de dicha secuencia inhibidora de JNK, o que media entre la actividad deseada *in vitro* o *in vivo*, mediante el uso de un sintetizador peptídico.

Una secuencia inhibidora de JNK tal como se usa aquí y se ha definido anteriormente puede modificarse además con una secuencia de tráfico, permitiendo que la secuencia inhibidora de JNK aquí usada y definida sea transportada eficazmente al interior de las células. Preferentemente, dicha secuencia inhibidora de JNK modificada se proporciona y usa como secuencia quimérica.

De acuerdo con un segundo aspecto la presente invención, se proporciona el uso de un péptido quimérico, que consiste en un primer dominio y un segundo dominio, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK, tal como se definió anteriormente, en un sujeto, comprendiendo el primer dominio del péptido quimérico una secuencia de tráfico y comprendiendo el segundo dominio del péptido quimérico una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2, estando unidos el primer dominio y el segundo dominio mediante un enlace covalente.

Habitualmente, los péptidos quiméricos tal como se usan de acuerdo con la presente invención tienen una longitud de al menos 25 residuos de aminoácido, por ejemplo de 25 a 250, en especial de 25 a 200, con especial preferencia de 25 a 150, de 25 a 100 y en particular de 25 a 50 residuos de aminoácido.

Como un primer dominio, el péptido quimérico aquí empleado comprende preferentemente una secuencia de tráfico típicamente seleccionada de entre cualesquiera secuencias de aminoácidos que dirigen péptidos (en las cuales está presente) a un destino celular deseado. Por tanto, la secuencia de tráfico tal como se usa aquí dirige típicamente el péptido a través de la membrana plasmática, por ejemplo desde el exterior de la célula, atravesando la membrana plasmática, hasta el interior del citoplasma. Alternativa o adicionalmente, la secuencia de tráfico puede dirigir al péptido a un punto deseado dentro de la célula, por ejemplo al núcleo, al ribosoma, al retículo endoplásmico (ER), a un lisosoma o peroxisoma, por ejemplo combinando dos componentes (un componente para la permeabilidad celular y otro para la localización nuclear) o mediante un solo componente que, por ejemplo, presenta propiedades de transporte en la membrana celular y dirigido a una diana, esto es de transporte intranuclear. La secuencia de tráfico puede comprender adicionalmente otro componente capaz de unir un componente citoplásmico o cualquier otro componente o compartimiento celular (por ejemplo retículo endoplásmico, mitocondria, aparato de Golgi, vesículas lisosomales). Así, por ejemplo, la secuencia de tráfico del primer dominio y la secuencia inhibidora de JNK del segundo dominio pueden estar localizadas en el citoplasma o en cualquier otro compartimiento celular. Esto permite localizar el péptido quimérico en la célula por absorción.

Preferentemente, la secuencia de tráfico (incluida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí) tiene una longitud de secuencia de 5 a 150 aminoácidos, en especial de 5 a 100 y con especial preferencia de 5 a 50, de 5 a 30 o incluso 5 a 15 aminoácidos.

5 En particular, la secuencia de tráfico (contenida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí) puede existir como una extensión de secuencia de aminoácidos continua en el primer dominio. Alternativamente, la secuencia de tráfico del primer dominio puede segmentarse en dos o más fragmentos de forma que la totalidad de estos fragmentos refleja la secuencia de tráfico entera y estos fragmentos pueden estar separados uno de otro por 1 a 10, preferentemente por 1 a 5 aminoácidos, con la condición de que la secuencia de tráfico como tal mantenga sus propiedades de transporte tal como se ha indicado anteriormente. Estos aminoácidos que separan los fragmentos de la secuencia de tráfico pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre secuencias de aminoácido que difieren de la secuencia de tráfico. Alternativamente, el primer dominio puede contener una secuencia de tráfico compuesta por más de un componente, cada componente con su propia función para el transporte de la secuencia de carga inhibidora de JNK del segundo dominio a un compartimiento específico de la célula, por ejemplo.

15 La secuencia de tráfico definida anteriormente puede estar compuesta de aminoácidos-L, aminoácidos-D o una combinación de ambos. Preferentemente, la secuencia de tráfico (incluida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí) puede comprender al menos 1 o incluso 2, preferiblemente al menos 3, 4 o 5, en especial al menos 6, 7, 8 o 9 e incluso más preferentemente al menos 10 o más aminoácidos D y/o L, donde los aminoácidos D y/o L pueden estar dispuestos en la secuencia de tráfico de JNK a modo de bloque, no en bloque o de forma alternada.

20 De acuerdo con una realización alternativa, la secuencia de tráfico del péptido quimérico que se usa aquí puede estar compuesta exclusivamente de aminoácidos-L. Preferentemente, la secuencia de tráfico del péptido quimérico tal como se usa aquí comprende o consiste en al menos una secuencia de tráfico "nativa" tal como se ha indicado anteriormente. En este contexto, el término "nativa" se refiere a secuencias de tráfico no alteradas compuestas enteramente por aminoácidos-L.

25 De acuerdo con otra realización alternativa, la secuencia de tráfico del péptido quimérico aquí empleada puede estar compuesta exclusivamente por aminoácidos-D. Preferentemente, la secuencia de tráfico del péptido quimérico tal como se usa aquí puede comprender un péptido D retroinverso de las secuencias indicadas anteriormente.

30 La secuencia de tráfico del primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí puede obtenerse a partir de fuentes naturales o producirse mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química (ver, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

35 Las fuentes que pueden emplearse para la secuencia de tráfico del primer dominio incluyen, por ejemplo, proteínas naturales tales como proteína TAT (tal como se describe en las Patentes US 5.804.604 y 5.674.980, por ejemplo, incorporadas aquí por referencia), VP22 (descrita por ejemplo en WO 97/05265; Elliott y O'Hare, *Cell* 88: 223-233 (1997)), proteínas no virales (Jackson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10691-10695 (1992)), secuencias de tráfico derivadas de *Antennapedia* (por ejemplo la secuencia portadora *antennapedia*) o a partir de péptidos básicos, por ejemplo péptidos con una longitud de 5 a 15 aminoácidos, preferentemente de 10 a 12 aminoácidos, y que comprenden al menos un 80%, en especial un 85% o incluso un 90% de aminoácidos básicos tales como arginina, lisina y/o histidina. Además, aquí se describen variantes, fragmentos y derivados de una de las proteínas nativas usadas como secuencias de tráfico. Con respecto a estas variantes, fragmentos y derivados, se hace referencia a la definición dada anteriormente para las secuencias inhibidoras de JNK tal como se usan aquí. Las variantes, fragmentos, así como también los derivados están correspondientemente definidos tal como se ha indicado anteriormente para las secuencias inhibidoras de JNK aquí empleadas. En particular, en el contexto de la secuencia de tráfico, una variante o fragmento o derivado puede definirse como una secuencia que comparte una identidad de secuencia con una de las proteínas nativas definidas anteriormente usadas como secuencia de tráfico de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o incluso un 99%.

45 En una realización preferente del péptido quimérico tal como se usa aquí, la secuencia de tráfico del primer dominio comprende o consiste en una secuencia derivada de la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana (HIV)1, en particular parte o todos los 86 aminoácidos que constituyen la proteína TAT.

50 Para una secuencia de tráfico (incluida en el primer dominio del péptido quimérico aquí empleado), pueden usarse secuencias parciales de la proteína TAT de longitud total formando un fragmento funcionalmente efectivo de la proteína TAT, es decir, un péptido TAT que incluye la región que media la entrada y la absorción en las células. Puede determinarse si dicha secuencia es un fragmento funcionalmente efectivo de la proteína TAT usando técnicas conocidas (ver por ejemplo Franked y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7397-7401 (1989)). Por tanto, la secuencia de tráfico del primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí puede derivarse de un fragmento o parte funcionalmente efectivos de una secuencia de proteína TAT que comprende menos de 86 aminoácidos y que es capaz de absorberse en las células, opcionalmente dentro del núcleo celular. Con especial preferencia, las secuencias parciales (fragmentos) de TAT que se usan como portador para mediar en la permeabilidad del péptido

quimérico a través de la membrana celular están diseñadas para comprender la región básica (aminoácidos 48 a 57 o 49 a 57) de la TAT de longitud total.

De acuerdo con una realización especialmente preferente, la secuencia de tráfico (incluida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí) puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que contiene los residuos 48-57 o 49 a 57 de TAT, en particular una secuencia TAT genérica $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RKKRRQRRR-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-genérico-TAT(s)) [SEC ID NO: 7] y/o $\text{XXXXRKKRRQ RRRXXXX}$ (L-genérico-TAT) [SEC ID NO: 21], siendo X o X_n^b como se han definido anteriormente. Además, la cantidad de residuos " X_n^b " en la SEC ID NO: 8 no está limitada a la descrita, pudiendo variar tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, la secuencia de tráfico incluida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí puede comprender o consistir en un péptido que contiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQRRR-COOH}$ (L-TAT) [SEC ID NO: 5].

De acuerdo con otra realización especialmente preferente, la secuencia de tráfico (incluida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí) puede comprender un péptido D retroinverso de las secuencias mostradas anteriormente, es decir la secuencia D retroinversa de la secuencia TAT genérica cuya secuencia es $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RRRQRRKKR-X}_n^b\text{-COOH}$ (D-genérico-TAT(s)) [SEC ID NO: 8] y/o XXXXRRRQRRKKRXXXX (D-genérico-TAT) [SEC ID NO: 22]. También en este caso X_n^b es como se ha definido anteriormente (preferiblemente representa D aminoácidos). Además, la cantidad de residuos " X_n^b " en la SEC ID NO: 8 no está limitada a la descrita, pudiendo variar tal como se ha indicado anteriormente. Con particular preferencia, la secuencia de tráfico tal como se usa aquí puede comprender la secuencia retroinversa D $\text{NH}_2\text{-RRRQRRKKRG-COOH}$ (D-TAT) [SEC ID NO: 6].

De acuerdo con otra realización, la secuencia de tráfico incluida en el primer dominio del péptido quimérico aquí empleado puede comprender o consistir en variantes de las secuencias de tráfico definidas anteriormente. Preferentemente, una "variante de una secuencia de tráfico" es una secuencia derivada de una secuencia de tráfico tal como se ha definido, comprendiendo la variante una modificación, por ejemplo por adición, delección (interna) (dando fragmentos) y/o por sustitución de al menos un aminoácido presente en la secuencia de tráfico definida anteriormente. Dichas modificaciones comprenden típicamente de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10 y en especial de 1 a 5 sustituciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos. Además, preferentemente la variante tiene una identidad de secuencia con la secuencia de tráfico definida, en particular con cualquiera de las SEC ID NO: 5 a 8 o 21-22, de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o incluso un 99%.

Preferiblemente, dicha modificación de la secuencia de tráfico incluida en el primer dominio del péptido quimérico tal como se usa aquí conduce a una secuencia de tráfico con mayor o menor estabilidad. Alternativamente, se pueden diseñar variantes de la secuencia de tráfico con el fin de modular la localización intracelular del péptido quimérico tal como se usa aquí. Cuando se agregan exógenamente, tales variantes definidas anteriormente se diseñan típicamente de forma que la capacidad de la secuencia de tráfico de penetrar en las células se mantiene (es decir, la absorción de la variante de la secuencia de tráfico en el interior de la célula es esencialmente similar a la de la proteína nativa empleada como secuencia de tráfico). Por ejemplo, la alteración de la región básica relevante para la localización nuclear (véase por ejemplo Dang y Lee, J. Biol. Chem. 264: 18019-18023 (1989); Hauber y col., J. Virol. 63: 1181-1187 (1989); y col., J. Virol. 63: 1-8 (1989)) puede resultar en una localización citoplásmica o parcialmente citoplásmica de la secuencia de tráfico y, por tanto, de la secuencia inhibidora de JNK como componente del péptido quimérico aquí empleado. Además, pueden introducirse otras modificaciones en la variante, por ejemplo mediante unión de por ejemplo colesterol u otros residuos lipídicos en la secuencia de tráfico con el fin de obtener una secuencia de tráfico con mayor solubilidad de membrana. Cualquiera de las variantes descritas anteriormente de las secuencias de tráfico incluidas en el primer dominio del péptido quimérico aquí empleado puede producirse mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia (véase por ejemplo Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual. 2da edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)

Como un segundo dominio, el péptido quimérico aquí empleado comprende típicamente una secuencia inhibidora de JNK según la SEC ID NO: 2, incluyendo derivados de la misma.

Ambos dominios, esto es el primer y el segundo dominio, del péptido quimérico aquí empleado pueden estar unidos de manera que forman una unidad funcional. Para unir ambos dominios puede aplicarse cualquier método conocido en la técnica.

De acuerdo con una realización, preferentemente el primer y segundo dominios del péptido quimérico aquí empleado está unido mediante enlace covalente. Un enlace covalente tal como se define aquí puede ser, por ejemplo, un enlace peptídico. Sin embargo, ambos dominios pueden estar unidos también mediante cadenas laterales o mediante un conector ("linker") químico.

El primer y el segundo dominios del péptido quimérico aquí empleado están presentes en una copia única, el primer dominio puede estar unido tanto al extremo N-terminal como al extremo C-terminal del segundo dominio. En otra realización no reivindicada, se pueden disponer múltiples copias de los dominios primero y segundo en cualquier orden posible. Por ejemplo, el primer dominio puede estar presente en el péptido quimérico tal como se usa aquí en

un número múltiple de copias, por ejemplo dos o tres o más copias, preferentemente dispuestas en orden consecutivo. Entonces, el segundo dominio puede estar presente como una única copia en el N-terminal o en el C-terminal de la secuencia que comprende el primer dominio. Alternativamente, el segundo dominio puede estar presente como un número de copias múltiple, por ejemplo dos, tres o más copias, y el primer dominio está presente en una única copia. De acuerdo con ambas alternativas, los dominios primero y segundo pueden darse en cualquier lugar en una disposición consecutiva. Disposiciones ilustrativas son las siguientes: por ejemplo, primer dominio – primer dominio – primer dominio – Segundo dominio; primerdominio–primer dominio–segundo dominio–primer dominio; primer dominio–segundo dominio–primer dominio–primer dominio; o por ejemplo segundo dominio – primer dominio – primer dominio – primer dominio.

Preferentemente, el primer y segundo dominios pueden unirse directamente uno al otro sin ningún conector. Alternativamente, pueden estar ligados uno al otro a través de una secuencia conectora que comprende de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos. Los aminoácidos que forman la secuencia conectora se seleccionan preferentemente de entre glicina o prolina como residuos aminoácidos. En especial, el primer y segundo dominios pueden estar separados uno del otro mediante una bisagra de dos, tres o más residuos prolina entre el primer y segundo dominio.

El péptido quimérico como se define arriba y se usa aquí, que consiste en un primer y un segundo dominios, puede estar compuesto por aminoácidos L, D o una combinación de los mismos. Aquí, el primer dominio (así como el enlazante empleado) puede estar compuesto por aminoácidos L, D o una combinación de ambos (por ejemplo L-TAT y D-IB1(s),etc.), consistiendo el segundo dominio en la SEQ ID NO: 2. Otros péptidos quiméricos no reivindicados como se describen aquí comprenden o consisten en los péptidos quiméricos de aminoácidos L según el péptido genérico L-TAT-IB NH₂-X_n^b-RKKRRQRRR-X_n^b-X_n^a-RPTTLXLXXXXXXXXXD-X_n^b-COOH (L-TAT-IB (genérico) (s)) [SEQ ID NO: 10], donde X, X_n^b y X_n^ason como se ha definido. Otro péptido quimérico específico puede comprender o consistir en el péptido quimérico de aminoácidos LNH₂-GRKKRRQRRRPPRKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH (L-TAT-IB1 (s)) [SEQ ID NO: 9]. Otro péptido quimérico puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos del péptido quimérico L GRKKRRQRRR PPDTYRPKRP TTLNLFQVPRSQDT (L-TAT-IB1) [SEQ ID NO: 23], o XXXXXXXRKK RRQRRXXXX XXXRPTTLX LXXXXXXXXXD S/TX (L-TATIB genérico) [SEQ ID NO: 24], donde X es como se ha definido arriba, o el péptido quimérico puede comprender o consistir en la secuencia peptídica quimérica de L aminoácidos RKKRRQRRRPPRKRPTTLNLFQVPRSQD (L-TAT-IB1(s1)) [SEQ ID NO:27], GRKKRRQRRR_n^cRKRPTTLNLFQVPRSQD (L-TAT-IB1(s2)) [SEQ ID NO: 28], o RKKRRQRRR_n^cRKRPTTLNLFQVPRSQD(L-TAT-IB1(s3)) [SEQ ID NO: 29]. En este contexto, cada X representa típicamente un residuo aminoácido como se ha definido anteriormente, típicamente X_n^c representa un segmento contiguo de residuos peptídicos, seleccionados independientemente de entre glicina o prolina, por ejemplo un segmento de glicina o de prolina monotónico, siendo n (el número de repeticiones de X_n^c) típicamente 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o incluso preferentemente 0-5 o 5-10.X_n^c puede representar tanto aminoácidos L como D.

Otros péptidos quiméricos no reivindicados tal como se describen aquí pueden comprender o consistir en péptidos quiméricos de aminoácidos D de los anteriormente descritos péptidos quiméricos de aminoácidos L. Ejemplos de péptidos quiméricos retro-inversos D según la presente invención son el péptido genérico D-TAT-IB NH₂-X_n^b-DQXXXXXXXXLXLTTPR-X_n^a-X_n^b-RRRQRRKKRX_n^b-COOH (D-TAT-IB (genérico) (s)) [SEQ ID NO: 12]. Aquí, X, X_n^a y X_n^bson tal como se han definido anteriormente (por ejemplo representan aminoácidos D). El péptido quimérico reivindicado tal como se usa aquí consiste en péptidos quiméricos de aminoácidos D según el péptido TAT-IB1 NH₂-DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRPPRRRQRRKKRG-COOH (D-TAT-IB1(s)) [SEQ ID NO: 11]. Otros péptidos quiméricos no reivindicados pueden comprender o consistir en las secuencias peptídicas de aminoácidos D TDQSRPVQPFNLNLTTPRKPRYTDPPRRRQRRKKRG(D-TAT-IB1) [SEQ ID NO: 25], o XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX(D-TAT-IB genérico) [SEQ ID NO: 26], donde es se ha definido anteriormente. El péptido quimérico como se usa aquí comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos D del péptido quimérico DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRPPRRR-QRRKKR(D-TAT-IB1(s1)) [SEQ ID NO: 30], DQSRPVQPFNLNLTTPRKPR-X_n^cRRRQRRKKRG(D-TAT-IB1(s2)) [SEQ ID NO: 31], o DQSRPVQPFNLNLTTPRKPRX_n^cRRRQRRKKR (D-TAT-IB1(s3)) [SEQ ID NO: 32], siendo X_n^c como se ha definido arriba.

El primer y segundo dominios del péptido quimérico tal como se ha definido anteriormente pueden estar unidos uno a otro por acoplamiento químico o bioquímico, el cual se realiza de cualquier forma apropiada conocida en la técnica, por ejemplo estableciendo un enlace peptídico entre el primer y el segundo dominio, por ejemplo por expresión de los dominios primer y segundo como una proteína de fusión, o por ejemplo reticulación del primer y segundo dominio del péptido quimérico tal como se ha definido anteriormente.

Muchos de los métodos conocidos apropiados para la reticulación química de los dominios primero y segundo del péptido quimérico definido son no específicos, es decir el punto de acoplamiento no está dirigido a ningún sitio particular del polipéptido de transporte o de la macromolécula de carga. Como resultado, el uso de agentes de reticulación no específicos puede atacar sitios funcionales o bloquear estéricamente sitios activos, convirtiendo a las proteínas conjugadas en biológicamente inactivas. Por tanto, preferentemente se usan métodos de reticulación que permitan un acoplamiento más específico de los dominios primero y segundo.

En este contexto, una forma de aumentar la especificidad del acoplamiento es un acoplamiento químico directo a un grupo funcional presente únicamente una vez o pocas veces en uno de los dominios a reticular o en ambos. Por ejemplo, la cisteína, que es el único aminoácido de proteína que contiene un grupo tiol, sólo está presente en muchas proteínas unas pocas veces. Igualmente, por ejemplo si un polipéptido no contiene residuos lisina, un reactivo de reticulación específico para aminas primarias será selectivo para el terminal amino de ese polipéptido. El éxito del uso de esta realización para aumentar la especificidad del acoplamiento requiere que el polipéptido tenga los residuos adecuados raros y reactivos en zonas de la molécula que puedan ser alteradas sin que se pierda su actividad biológica. Pueden reemplazarse los residuos cisteína cuando ocurren en partes de una secuencia polipeptídica donde su participación en una reacción de reticulación podría interferir probablemente en la actividad biológica. Cuando se reemplaza un residuo cisteína, típicamente es deseable minimizar los cambios resultantes en el plegamiento polipeptídico. Estos cambios se minimizan cuando el reemplazo es por una especie química y estéricamente similar a la cisteína. Por estas razones, para reemplazar la cisteína es preferente la serina. Tal como se demuestra en los ejemplos siguientes, con el fin de la reticulación puede introducirse un residuo cisteína en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Cuando se introduce un residuo cisteína, preferentemente la introducción se lleva a cabo en o cerca del terminal amino o carboxi. Se pueden emplear métodos convencionales para dichas modificaciones de la secuencia de aminoácidos donde el polipéptido de interés se produce por síntesis química.

El acoplamiento del primer y segundo dominios del péptido quimérico definido anteriormente y usado aquí puede realizarse también mediante un agente de acoplamiento o conjugación. Existen diversos reactivos de reticulación intermolecular que pueden utilizarse (ver por ejemplo Means y Feeney, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 1974, pp. 39-43). Entre estos reactivos están, por ejemplo, propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilén)bismaleimida (ambos altamente específicos para los grupos sulfhidrilo y formadores de enlaces irreversibles); N,N'-etilen-bis(yodo acetamida) u otros reactivos que tienen puentes metileno de 6 a 11 carbonos (relativamente específicos para los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno (que forma enlaces irreversibles con los grupos amina y tirosina). Otros reactivos de reticulación útiles para este propósito incluyen p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona, que forman enlaces de reticulación irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (específico para grupos amino); fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con grupos amino); hexametilen-diisocianato o diisotiocianato o azofenil-p-diisocianato (reaccionan principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobenzidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

Los reactivos de reticulación empleados para reticular el primer dominio y el segundo dominio del péptido quimérico definido pueden ser homobifuncionales, es decir tener dos grupos funcionales que participan en la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferente es bismaleimidoheptano (BMH). El BMH contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo bajo condiciones suaves (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están unidos por una cadena hidrocarburo, por tanto BMH es útil para la reticulación irreversible de polipéptidos que contienen residuos cisteína.

Los reactivos de reticulación empleados para reticular el primer y el segundo dominio del péptido quimérico definido pueden ser también heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo amina-reactivo y un grupo tiol-reactivo que reticulará dos proteínas que tienen aminas y tioles libres, respectivamente. Ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales son 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), m-maleimidobenzoil éster de N-hidroxisuccinimida (MBS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), un análogo de cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estos agentes de reticulación reacciona con una amina primaria, formando la maleimida tiol-reactiva un enlace covalente con el tiol de un residuo cisteína.

Los reactivos de reticulación apropiados para la reticulación del primer y segundo dominios del péptido quimérico definido a menudo tienen una baja solubilidad en agua. Por ello, puede añadirse una parte hidrofílica, tal como un grupo sulfonato, al reactivo de reticulación con el fin de mejorar su solubilidad en agua. En este sentido, Sulfo-MBS y Sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados para ser solubles en agua que pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Asimismo, muchos reactivos de reticulación resultan en un conjugado que es esencialmente no disociable bajo condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de reticulación particularmente apropiados para la reticulación del primer y segundo dominios del péptido quimérico definido presentan un enlace covalente, tal como disulfuro, disociable bajo condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son reticulantes disociables bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación disociable permite que la parte de carga se separe del polipéptido de transporte después de su liberación en la célula diana. El enlace disulfuro directo también puede ser útil.

Numerosos reactivos de reticulación, incluyendo aquellos citados anteriormente, son comerciales. Las instrucciones detalladas de uso son fácilmente asequibles de los proveedores comerciales. Una referencia general sobre la reticulación de proteínas y la preparación de conjugados es Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press (1991).

- La reticulación química del primer y segundo dominios del péptido quimérico aquí definido puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores dotan de flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre partes conjugadas y, por ello, pueden ayudar a preservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede tener la forma de un residuo polipeptídico que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo prolina. Alternativamente un brazo espaciador puede ser parte del reactivo de reticulación, tal como en "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, IL., cat. No. 21651 H).
- También se describen aquí variantes, fragmentos, o derivados de uno de los péptidos quiméricos arriba descritos. Con respecto a los fragmentos y variantes, se hace referencia a la definición dada anteriormente para las secuencias inhibitoras de JNK.
- Una "variante de un péptido quimérico" es típicamente una secuencia derivada de cualquiera de las secuencias de acuerdo con las SEQ ID NO: 9 a 12 y 23 a 32, comprendiendo la variante quimérica alteraciones de aminoácidos de los péptidos quiméricos según las SEQ ID NO: 9 a 12 y 23 a 32. Tales alteraciones típicamente comprenden 1 a 20, preferentemente 1 a 10, en especial 1 a 5 sustituciones, adiciones y/o deleciones (dando fragmentos) de los aminoácidos según las SEQ IDNO: 9 a 12 y 23 a 32, donde el péptido quimérico alterado como se usa aquí presenta una identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias según SEQ ID NO: 9-12 y 23 a 32 de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 70%, 80%, o un 95%, 98%, o incluso un 99%. Estas variantes mantienen la actividad biológica de los dominios primero y segundo contenidos en el péptido quimérico aquí empleado, esto es la actividad de tráfico del primer dominio como se ha descrito anteriormente y la actividad del segundo dominio para enlazar a JNK y/o inhibir la activación de al menos un factor de transcripción activado de JNK.
- Correspondientemente, el péptido quimérico como se aquí también comprende fragmentos de los péptidos quiméricos, en particular de las secuencias peptídicas quiméricas según cualquiera de las SEQ ID NO: 25, 30 a 32. Así, en el contexto de la presente invención, un "fragmento del péptido quimérico" preferentemente es una secuencia derivada de cualquiera de las secuencias según SEQ ID NO: 25, 30 a 32.
- Finalmente, el péptido quimérico tal como se usa aquí también comprende derivados de los anteriormente descritos péptidos quiméricos, en particular de las secuencias peptídicas quiméricas según las SEQ ID NO: 11 y 30 a 32.
- Las secuencias inhibitoras de JNK y/o los péptidos quiméricos definidos aquí, así como también sus fragmentos, variantes o derivados, pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a estos componentes peptídicos. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena única y una genoteca de Fab. Para la producción de estos anticuerpos pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica.
- A modo de ejemplo, pueden inmunizarse animales huésped para que produzcan anticuerpos policlonales mediante inyección con cualquier péptido quimérico o secuencia inhibitora de JNK definidos anteriormente. Pueden usarse varios coadyuvantes para incrementar así la respuesta inmunológica, incluyendo pero sin limitarse a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (por ejemplo lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenoles, etc.), CpG, polímeros, Pluronic y adyuvantes humanos tales como bacillus de Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*.
- Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el péptido quimérico o a una secuencia inhibitora de JNK tal como se ha definido, puede utilizarse cualquier técnica que provea la producción de moléculas de anticuerpos mediante cultivo continuo de un linaje celular. Dichas técnicas incluyen, pero no están limitadas a, técnicas de hibridoma (ver Kohler y Milstein, 1975. Nature 256: 495-497); técnicas de trioma; técnicas de hidridoma de células B humanas (ver Kozbor y col., 1983, Immunol Today 4: 72) y técnicas de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (ver Cole y col., 1985. En: Monoclonal Antibodies y Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden utilizarse en la práctica de la presente invención y pueden producirse mediante el uso de hibridomas humanos (ver Cole y col., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o mediante transformación de células B humanas con el virus de Epstein Barr *in vitro* (ver Cole y col., 1985. En: Monoclonal Antibodies y Cancer Therapy (Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)).
- Las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos de cadena única específicos para las secuencias inhibitoras de JNK y los péptidos quiméricos tal como se definen aquí (ver por ejemplo la Patente US 4.946.778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de genotecas de expresión Fab (ver por ejemplo Huse y col., 1989. Science 246: 1275-1281) con el fin de permitir una identificación rápida y eficaz de los fragmentos Fab monoclonales de especificidad deseada para estas secuencias inhibitoras de JNK y/o péptidos quiméricos. Los anticuerpos no humanos pueden ser "humanizados" mediante técnicas bien conocidas (ver por ejemplo la Patente US 5.225.539). Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos para una secuencia inhibitora de JNK y/o péptido quimérico tal como se define aquí pueden obtenerse por técnicas conocidas, incluyendo por ejemplo (i) un fragmento F(ab')₂ producido por digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado por reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos Fv.

Métodos que pueden utilizarse para rastrear ("screening") anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no están limitados a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas mediadas inmunológicamente conocidas. En una realización específica, la selección de anticuerpos específicos para un epitopo particular de una secuencia inhibidora de JNK y/o un péptido quimérico tal como se define aquí (por ejemplo, un fragmento del mismo que comprende típicamente una longitud de 5 a 20, preferiblemente de 8 a 18 y en especial de 8 a 11 aminoácidos) es facilitada por la generación de hibridomas que se unen al fragmento que posee dicho epitopo de una secuencia inhibidora de JNK y/o un péptido quimérico tal como el definido aquí. Aquí también se proporcionan estos anticuerpos que son específicos para un epitopo tal como el definido anteriormente.

Los anticuerpos aquí definidos pueden aplicarse a métodos conocidos en la técnica en referencia a la localización y/o cuantificación de una secuencia inhibidora de JNK (y/o correspondientemente a un péptido quimérico tal como se ha definido anteriormente), por ejemplo para su uso en la medida de los niveles de péptido en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos de diagnóstico o en la formación de imágenes del péptido y similares.

Las secuencias inhibidoras de JNK, los péptidos quiméricos y/o anticuerpos definidos de acuerdo con la invención pueden formularse en una composición farmacéutica, la cual puede aplicarse en la prevención o tratamiento de cualquiera de las enfermedades definidas aquí, particularmente en la prevención o tratamiento de enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK, tal como se ha indicado. Típicamente, dicha composición farmacéutica usada de acuerdo con la presente invención incluye como componente activo, por ejemplo, (i) cualquiera de una o más de las secuencias inhibidoras de JNK y/o péptidos quiméricos como los definidos anteriormente y/o sus variantes, fragmentos o derivados, en particular secuencias inhibidoras de JNK de acuerdo con la secuencia SEC ID NO: 2 y/o péptidos quiméricos de acuerdo con la SEC ID NO: 11 y 30 a 32 y/o secuencias inhibidoras de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que comprenden una secuencia de tráfico según cualquiera de las SEC ID NO: 5 a 8 y 21 a 22, o variantes o fragmentos de la misma dentro de las definiciones anteriores.

De acuerdo con una realización preferente, dicha composición farmacéutica tal como se usa de acuerdo con la presente invención comprende típicamente una cantidad segura y eficaz de un componente tal como el definido anteriormente, preferentemente de al menos una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la secuencia de la SEC ID NO: 2 y/o al menos un péptido quimérico de acuerdo con la SEC ID NO: 11 y 30 a 32, y/o al menos una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que comprende una secuencia de tráfico de acuerdo con cualquiera de las SEC ID NO: 5-8 y 21 a 22, o variantes o fragmentos de la misma dentro de las definiciones anteriores.

Los inventores de la presente invención han descubierto además que la secuencia inhibidora de JNK y el péptido quimérico, respectivamente, tal como se definen aquí, presentan una tasa de absorción particularmente alta en las células implicadas en las enfermedades de la presente invención. Por ello, la cantidad de secuencia inhibidora de JNK y de péptido quimérico, respectivamente, en la composición farmacéutica a administrar a un sujeto puede consistir en una dosis muy baja, aunque sin limitarse a ello. Por consiguiente, la dosis puede ser muy inferior a la correspondiente en el caso de los fármacos peptídicos conocidos en la técnica, como DTS-108 (Florence Meyer-Losic y col., Clin Cancer Res., 2008, 2145-53). Esto tiene varios aspectos positivos, por ejemplo una disminución de las reacciones secundarias potenciales y del coste.

Preferentemente, la dosis (por kg de peso corporal) está en un rango de hasta 10 mmol/kg, preferentemente de hasta 1 mmol/kg, de forma especialmente preferente de hasta 100 µmol/kg, de forma más preferente de hasta 10 µmol/kg, de forma particularmente preferente de hasta 1 µmol/kg, incluso de hasta 100 nmol/kg y de forma totalmente preferente de hasta 50 nmol/kg.

Así, preferentemente el intervalo de dosis puede ser de entre aproximadamente 1 pmol/kg y aproximadamente 1 mmol/kg, entre aproximadamente 10 pmol/kg y aproximadamente 0,1 mmol/kg, entre aproximadamente 10 pmol/kg y aproximadamente 0,01 mmol/kg, entre aproximadamente 50 pmol/kg y aproximadamente 1 µmol/kg, entre aproximadamente 100 pmol/kg y aproximadamente 500 nmol/kg, entre aproximadamente 200 pmol/kg y aproximadamente 300 nmol/kg, entre aproximadamente 300 pmol/kg y aproximadamente 100 nmol/kg, entre aproximadamente 500 pmol/kg y aproximadamente 50 nmol/kg, entre aproximadamente 750 pmol/kg y aproximadamente 30 nmol/kg, entre aproximadamente 250 pmol/kg y aproximadamente 5 nmol/kg, entre aproximadamente 1 nmol/kg y aproximadamente 10 nmol/kg, o una combinación de dos cualesquiera de estos valores.

En este contexto, la prescripción de tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosis, etc., cuando se usa la composición farmacéutica anterior cae dentro de la responsabilidad del facultativo y otros doctores en medicina, típicamente teniendo en cuenta el trastorno a tratar, el estado de cada paciente individual, el sitio de liberación, la vía de administración y otros factores conocidos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden hallarse en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980. Por consiguiente, "una cantidad segura y eficaz" tal como se ha indicado anteriormente para los componentes de las composiciones farmacéuticas a usar de acuerdo con la presente invención significa una cantidad de cada una o de todos estos componentes suficiente para inducir una modificación positiva significativa de enfermedades o trastornos

estrechamente relacionados con la señalización de JNK, tal como se ha definido aquí. Al mismo tiempo, sin embargo, la "cantidad segura y eficaz" es lo suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios graves, esto es permite una relación adecuada entre ventajas y riesgos. La determinación de estos límites cae dentro del alcance del juicio médico. La "cantidad segura y eficaz" de dicho componente variará según la enfermedad particular a tratar y también según la edad y el estado físico del paciente, la gravedad de la enfermedad, la duración del tratamiento, la naturaleza de terapias coadyuvantes, de los vehículos farmacéuticamente aceptables empleados y de factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden usarse, de acuerdo con la invención, en humanos y también con propósitos médicos veterinarios.

La composición farmacéutica tal como se usa de acuerdo con la presente invención puede comprender, además de una de estas sustancias, un vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible), excipientes, tampones, estabilizantes u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia.

En este contexto, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible)" incluye preferentemente la base líquida o no líquida de la composición. El término "compatible" significa que los constituyentes de la composición farmacéutica tal como se usa aquí pueden mezclarse con el componente farmacéuticamente activo definido anteriormente y con otros componentes sin que se produzca una interacción que pueda reducir sustancialmente la eficacia farmacéutica de la composición bajo las condiciones de uso normales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables deben tener una pureza lo suficientemente elevada y una toxicidad lo suficientemente baja apropiadas como para ser administrados a una persona a tratar.

Cuando la composición farmacéutica aquí empleada se proporciona en forma líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprenderá típicamente uno o más vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables (compatibles). Como vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables (compatibles), la composición puede comprender, por ejemplo, agua libre de pirógenos, soluciones salinas isotónicas o tamponadas (acuosas) tales como soluciones tampón fosfato, citrato, etc, aceites vegetales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma, polioles como polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol, ácido alginico, etc. En particular, para la inyección de la composición farmacéutica aquí empleada puede usarse un tampón, preferentemente acuoso.

Cuando la composición farmacéutica aquí empleada se proporciona en forma sólida, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprenderá típicamente uno o más vehículos sólidos farmacéuticamente aceptables (compatibles). Como vehículos sólidos farmacéuticamente aceptables (compatibles), la composición puede comprender, por ejemplo, una o más cargas o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o pueden usarse también compuestos encapsulantes apropiados para la administración a una persona. Ejemplos de tales vehículos sólidos farmacéuticamente aceptables (compatibles) son azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones como almidón de maíz o almidón de patata, celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa, tragacanto en polvo, malta, gelatina, sebo; agentes deslizantes sólidos como ácido esteárico, estearato de magnesio, sulfato de calcio, etc.

La naturaleza precisa del vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible) o de otro material puede depender de la vía de administración. Así, la selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible) puede decidirse en principio de acuerdo a la forma de administración de la composición farmacéutica empleada de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica empleada de acuerdo con la invención puede administrarse, por ejemplo, sistémicamente. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, vías parenterales (por ejemplo por inyección), tales como vías intravenosas, intramusculares, subcutáneas, intradérmicas o transdérmicas, etc., vías entéricas como vías orales o rectales, etc., vías tópicas como nasales o intranasales, etc., u otras vías como las vías epidérmica o la liberación desde parches.

La cantidad apropiada de la composición farmacéutica empleada puede determinarse mediante experimentos rutinarios en modelos animales. Dichos modelos incluyen, sin implicar ninguna limitación, conejos, ovejas, ratones, ratas, perros y modelos de primates no humanos. Las formas de dosificación unitaria preferentes para la inyección incluyen soluciones estériles acuosas, en solución fisiológica salina o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones debe ajustarse a aproximadamente 7,4. Vehículos apropiados para la inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica incluyen aquellos adecuados en lociones, cremas, geles y similares. Si el compuesto debe administrarse vía peroral, son preferentes las tabletas, cápsulas y similares, siendo estas formas de dosificación unitarias preferentes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la preparación de dosis unitarias que pueden usarse en la administración oral son bien conocidos en la técnica anterior. La selección de los mismos dependerá de consideraciones secundarias tales como el sabor, el coste y la estabilidad de almacenamiento, que no son críticas para los propósitos de la presente invención y que pueden determinarse sin dificultad por un experto en la materia.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de tabletas, cápsulas, polvos o líquidos. Una tableta puede incluir un vehículo sólido tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo gelatina, y opcionalmente un coadyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas para la administración oral generalmente

incluyen un vehículo líquido tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También pueden incluirse soluciones salinas fisiológicas, dextrosa u otras soluciones de sacáridos, o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

5 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o en el sitio relevante, el ingrediente activo estará en forma de solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia podrán preparar soluciones apropiadas usando por ejemplo vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer lactada. Si es necesario pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos. Tanto si es un polipéptido, un péptido o una molécula de ácido nucleico u otros compuestos farmacéuticamente útiles de acuerdo con la presente invención que
10 deben ser administrados a un individuo, preferentemente la administración es de una cantidad “profilácticamente efectiva” o de una “cantidad terapéuticamente efectiva” (según sea el caso) que sea suficiente para beneficiar al individuo. La cantidad real administrada, así como el régimen y la duración de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad del sujeto a tratar.

15 La prevención y/o el tratamiento de una enfermedad tal como se ha definido aquí incluyen típicamente la administración de una composición farmacéutica como la definida anteriormente. El término “modular” incluye suprimir la expresión de JNK cuando está hiperexpresada en cualquiera de las enfermedades anteriores. También incluye suprimirla fosforilación de c-jun, ATF2 o NFAT4 en cualquiera de las enfermedades anteriores, por ejemplo mediante el uso de al menos una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 y/o de al menos un péptido químérico de acuerdo con la SEC ID NO: 11 y 30 a 32 y/o de al menos una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que comprende una secuencia de tráfico según cualquiera de las SEC ID NO: 5 a 8 y
20 21 a 22, o variantes o fragmentos de la misma dentro de las definiciones anteriores, como inhibidor competitivo del sitio de unión de c-jun, ATF2 y NFAT4 naturales en una célula. El término “modular” incluye también suprimir complejos hetero- y homoméricos de los factores de transcripción integrados por c-jun, ATF2 o NFAT4, sin limitarse a los mismos, y sus pares relacionados, por ejemplo el complejo AP-1 que está integrado por c-jun, AFT2 y c-fos. Cuando una enfermedad o trastorno estrechamente relacionado con la señalización de JNK como se ha definido anteriormente están asociadas a la hiperexpresión de JNK, dichas secuencias inhibidoras de JNK supresoras pueden ser introducidas en una célula. En algunos casos “modular” puede incluir aumentar la expresión de JNK, por ejemplo usando un anticuerpo específico de péptido IB que bloquea la unión de un péptido IB a JNK, evitando así la inhibición de JNK mediante un péptido relacionado con IB.

25 La prevención y/o el tratamiento de un sujeto con la composición farmacéutica descrita anteriormente se lleva a cabo típicamente mediante la administración (*in vivo*) de una cantidad (“terapéuticamente efectiva”) de dicha composición farmacéutica a un sujeto, siendo el sujeto, por ejemplo, cualquier mamífero como seres humanos, primates, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo o cerdo. El término “terapéuticamente efectiva” significa que el componente activo de la composición farmacéutica está en cantidad suficiente para mejorar la enfermedad o el trastorno estrechamente
30 relacionado con la señalización de JNK definida anteriormente.

Por consiguiente, cualquier péptido tal como el definido anteriormente, por ejemplo al menos una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 y/o al menos un péptido químérico de acuerdo con la SEC ID NO: 11 y 30 a 32 y/o al menos una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que comprende una secuencia de tráfico según cualquiera de las SEC ID NO: 5 a 8 y 21 a 22, o sus variantes o fragmentos dentro
40 de las definiciones anteriores, pueden utilizarse en una realización específica de la presente invención para tratar enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo modulando las vías de señalización de JNK activadas.

45 Para tratar enfermedades tales como las aquí citadas, pueden aplicarse terapias dirigidas para liberar las secuencias inhibidoras de JNK y/o los péptidos químéricos definidos anteriormente más específicamente a ciertos tipos de células, usando sistemas diana tales como anticuerpos (diana) o ligandos específicos celulares. Los anticuerpos para dirigirse a una diana son típicamente específicos para las proteínas de la superficie de las células asociadas a cualquiera de las enfermedades definidas a continuación. A modo de ejemplo, estos anticuerpos pueden dirigirse a anticuerpos de la superficie celular tales como proteínas de superficie asociadas a células B, por ejemplo proteínas DR de MHC clase II, CD18 (LFA-1 cadena beta), CD45RO, CD40 o Bgp95, proteínas de superficie de células seleccionadas de entre por ejemplo CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD13, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD39, CD4, CD43, CD45, CD52, CD56, CD68, CD71, CD138, etc. Los constructos diana pueden prepararse típicamente uniendo de forma covalente las secuencias inhibidoras de JNK y los péptidos químéricos definidos aquí, de acuerdo con la invención, a un anticuerpo específico
50 para una proteína de la superficie celular o mediante su unión a un ligando celular específico. Por ejemplo, las proteínas pueden enlazarse a dicho anticuerpo o pueden unirse al mismo mediante un enlace peptídico o por acoplamiento químico, reticulación, etc. La terapia dirigida puede llevarse a cabo administrando el constructo diana en una cantidad farmacéuticamente efectiva para un paciente mediante cualquiera de las vías de administración definidas a continuación, por ejemplo las vías intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral y de liberación desde parche. Preferentemente, las secuencias inhibidoras de JNK o los péptidos químéricos aquí definidos de acuerdo con la
55 invención que están unidos a los anticuerpos diana o a ligandos celulares específicos tales como los definidos anteriormente pueden liberarse *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo por hidrólisis del enlace covalente, mediante peptidasas
60

o por cualquier otro método apropiado. Alternativamente, si las secuencias inhibitoras de JNK o los péptidos quiméricos aquí definidos de acuerdo con la invención se unen a un ligando específico de células pequeñas, puede no llevarse a cabo la liberación del ligando. Si están presentes en la superficie de la célula, los péptidos quiméricos pueden entrar en ésta por la actividad de su secuencia de tráfico. La dirección a una diana puede ser deseable por diversas razones; por ejemplo, si las secuencias inhibitoras de JNK y los péptidos quiméricos aquí definidos de acuerdo con la invención son inaceptablemente tóxicos o si, por otra parte, requerirían una dosis demasiado elevada.

Alternativamente, las secuencias inhibitoras de JNK y/o los péptidos quiméricos aquí definidos podrían administrarse en una forma precursora mediante el uso de un anticuerpo. Estas secuencias inhibitoras de JNK y/o péptidos quiméricos pueden convertirse luego a su forma activa mediante un agente activador producido en o dirigido a las células a tratar. Este tipo de realización se conoce a veces como ADEPT (terapia enzimática de pro-fármaco dirigido al anticuerpo), que implica dirigir el agente activador a las células por conjugación con un anticuerpo celular específico.

De acuerdo con otra realización, las secuencias inhibitoras de JNK, los péptidos quiméricos o los anticuerpos para las secuencias inhibitoras de JNK o para los péptidos quiméricos aquí definidos, por ejemplo una secuencia inhibitora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 y/o un péptido quimérico de acuerdo con cualquiera de las SEC ID NO: 11 y 30 a 32 y/o una secuencia inhibitora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que comprende una secuencia de tráfico según cualquiera de las SEC ID NO: 5 a 8 y 21 a 22 o sus variantes o fragmentos dentro de las definiciones anteriores, pueden utilizarse en ensayos (*in vitro*) (por ejemplo inmunoensayos), para detectar, pronosticar, diagnosticar o controlar diversas afecciones y estados de enfermedad seleccionados de entre enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK definida anteriormente, o para monitorear su tratamiento. El inmunoensayo puede llevarse a cabo mediante un método que comprende poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo para una secuencia inhibitora de JNK o para un péptido quimérico como los definidos anteriormente bajo las condiciones que permitan la unión inmuno-específica y entonces la detección o medida de la cantidad de cualquier unión inmuno-específica mediante el anticuerpo. En una realización específica, puede emplearse un anticuerpo específico para una secuencia inhibitora de JNK o un péptido quimérico para analizar una muestra de tejido o suero de un paciente con el fin de determinar la presencia de JNK o de una secuencia inhibitora de JNK; siendo un nivel aberrante de JNK indicativo de enfermedad. Los inmunoensayos a utilizar incluyen, pero no están limitados a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos con técnicas tales como Western Blot, radioinmunoensayos (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina con difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos e inmunoensayos de proteína A, etc. Alternativamente, pueden llevarse a cabo ensayos (*in vitro*) mediante la liberación de las secuencias inhibitoras de JNK, péptidos quiméricos o anticuerpos para secuencias inhibitoras de JNK o para péptidos quiméricos, tal como se han definido anteriormente, para llegar a células diana, típicamente seleccionadas de entre, por ejemplo, células animales, humanas o microorganismos cultivados, y para controlar la respuesta de las células por métodos biofísicos bien conocidos por los expertos en la materia. Las células diana habitualmente empleadas pueden ser células cultivadas (*in vitro*) o células *in vivo*, es decir células que componen órganos o tejidos de animales o seres humanos vivos, o microorganismos que se encuentran en animales o seres humanos vivos.

La presente invención adicionalmente proporciona el uso de kits de diagnóstico o con fines terapéuticos, en particular para el tratamiento, prevención o control de enfermedades o trastornos estrechamente relacionados con la señalización de JNK tal como se definió anteriormente, incluyendo dicho kit uno o más recipientes que contienen secuencias inhibitoras de JNK, péptidos quiméricos y/o anticuerpos para estas secuencias inhibitoras de JNK o para péptidos quiméricos tal como se han descrito anteriormente, por ejemplo un anticuerpo de la secuencia inhibitora anti-JNK para una secuencia inhibitora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2, para un péptido quimérico de acuerdo con las SEC ID NO: 11 y 30 a 32, para una secuencia inhibitora JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que comprende una secuencia de tráfico según cualquiera de las SEC ID NO: 5 a 8 y 21 a 22, o para sus variantes o fragmentos dentro de las definiciones anteriores o tales como un anticuerpo de la secuencia inhibitora de anti-JNK y opcionalmente un par de unión marcado para el anticuerpo. El marcador incorporado en el anticuerpo puede incluir, pero no está limitado a, un grupo quimioluminiscente, enzimático, fluorescente, colorimétrico o radioactivo. El kit puede comprender opcionalmente además una cantidad predeterminada de una secuencia inhibitora de JNK purificada tal como la definida anteriormente o un péptido quimérico tal como el definido anteriormente para su uso como diagnóstico, modelo o control en los ensayos para los propósitos anteriores.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan aquí tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describirán métodos y materiales apropiados. En caso de conflicto, la presente especificación incluyendo las definiciones será la referencia. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no limitativos. Otras características y ventajas de la invención resultarán aparentes de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- Fig. 1A-C: diagramas que muestran las alineaciones de regiones de dominio JBD conservadas en los factores de transcripción indicados. Las secuencias inhibitoras de JNK aquí usadas fueron identificadas por alineaciones de secuencia. Los resultados de esta alineación son los ejemplos que se muestran en las Fig. 1A-1C. La Figura 1A describe la región de mayor homología entre los JBD de IB1, IB2, c-Jun y ATF2. El Panel B describe la secuencia de aminoácidos de las JBD de L-IB1(s) y L-IB1 con fines comparativos. Los residuos totalmente conservados se indican con asteriscos, mientras que los residuos cambiados a Ala en el vector GFP-JBD_{23Mut} se indican con círculos abiertos. La Figura 1C muestra las secuencias de aminoácidos de proteínas quiméricas que incluyen una secuencia inhibitora de JNK y una secuencia de tráfico. En el ejemplo, la secuencia de tráfico se deriva del polipéptido TAT del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y la secuencia inhibitora de JNK de un polipéptido IB1(s). Las secuencias humanas, de ratón y rata son idénticas en los paneles B y C.
- Fig. 2: diagrama que muestra las secuencias de los péptidos de fusión genérica TAT-IB de ser humano, ratón y rata.
- Fig. 3: muestra los resultados de la inhibición de la actividad de JNK endógena en células HepG2 con los péptidos de fusión según las SEC ID NO: 9 y 11 en una realización de un solo pocillo. Tal como puede observarse en la Fig. 3, particularmente el Panel D, D-TAT-IB1(s) de la SEC ID NO: 11 (abreviada aquí como D-JNKI) inhibe eficazmente la actividad de JNK, incluso mejor que la L-TAT-IB1(s) de SEC ID NO: 9 (abreviada aquí como L-JNKI).
- Fig. 4: muestra el resultado del ensayo de citotoxicidad con una secuencia inhibitora de JNK de SEC ID NO: 11, denominada también XG-102 (ver Ejemplo 12). Tal como puede observarse, XG-102 (SEC ID NO: 11) no es citotóxica para HFFs. Se sembraron HFFs en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Se añadió DMSO conteniendo medio (mismo nivel que el medicamento, 5 μ M) o XG-102 a 1, 2, y 5 μ M durante 24 h. Se agregó brevemente Red Neutro, las células se fijaron y se extrajo el colorante. Se midió la absorbancia a 540nm. No se observó diferencia entre DMSO y 1 μ M XG-102.
- Fig. 5: muestra los resultados del ensayo de reducción de placas llevado a cabo para ensayar la actividad de una secuencia quimérica de JNK de SEC ID NO: 11, denominada también XG-102, contra el virus de Varizella Zoster (VZV) (ver Ejemplo 12). Tal como puede observarse, XG-102 (SEC ID NO: 11) es un potente inhibidor del virus de la varicela Zoster (VZV), en particular a concentraciones de 0,5 μ M y 1 μ M.
- Fig. 6: muestra los resultados de la inhibición del virus de la varicela Zoster (VZV) en fibroblastos humanos cultivados usando una secuencia quimérica inhibitora de JNK de SEC ID NO: 11, denominada también XG-102 (ver Ejemplo 12). Tal como puede observarse, VZV muestra una sensibilidad significativa a XG-102 (SEC ID NO: 11). La replicación de VZV fue normal en presencia del control negativo (XG-100, el péptido Tat solo). XG-102 (SEC ID NO: 11) evita por tanto la replicación de VZV que está ya en el nivel de concentración más bajo ensayado de 0,25 μ M.
- Fig. 7: muestra la actividad de XG-102 (SEC ID NO: 11) sobre el reclutamiento de células en pulmón usando MPO en homogenado de pulmón en el tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en un modelo animal de inflamación aguda de pulmón inducida por Bleomicina. Tal como puede observarse, MPO no fue inducido significativamente después de la administración de bleomicina. XG-102 (SEC ID NO: 11), tenía por tanto muy poco efecto sobre los niveles pulmonares de MPO.
- Fig. 8: muestra la actividad de XG-102 (SEC ID NO: 11) sobre los niveles de TNF en el tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en un modelo animal de fibrosis pulmonar aguda inducida por Bleomicina. Cuando se miden los niveles de TNF, se observa una tendencia a la reducción del nivel de TNF en BALF después de la administración de XG-102 (SEC ID NO: 11) en el modelo BLM. Los niveles de TNF son muy bajos después de BLM.
- Fig. 9: muestra la actividad de XG-102 (SEC ID NO: 11) sobre el reclutamiento de células en el espacio de lavado broncoalveolar en el tratamiento de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en un modelo animal de fibrosis aguda inducida por Bleomicina. A 0,1 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) reduce significativamente el reclutamiento de linfocitos y la cantidad de células totales reclutadas durante la etapa inflamatoria caracterizada en este punto por el reclutamiento de linfocitos. A 0,1 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) mejora el reclutamiento de linfocitos o la cantidad de células totales en el espacio broncoalveolar (n= 5 ratones por grupo; *p < 0,05; **p < 0,001).
- Fig. 10: muestra los resultados histológicos del tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en un modelo animal de fibrosis pulmonar aguda inducida por Bleomicina. Se tiñeron secciones de 3 μ m de pulmón con hematoxilina y eosina. 10 días después de la administración de BLM, se observó la acumulación de células inflamatorias, las áreas fibróticas, la pérdida de arquitectura pulmonar. Tal como puede verse, se observó una disminución de estos parámetros después de la administración de XG-102 a dosis bajas (0,001 mg/kg), pero no a dosis altas (0,1 mg/kg).
- Fig. 11: muestra los efectos del tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) en los niveles cerebrales de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ determinados por ELISA. Los gráficos representan los niveles A β ₁₋₄₀ (izquierda) y A β ₁₋₄₂

- (derecha) determinados por ELISA en diferentes fracciones de homogeneizado de cerebro con Triton 40 y Triton 42. Los datos se representan con gráficos de puntos dispersos en valores individuales (negro) y el promedio \pm SEM. Se marcan el nivel de significación con asteriscos (* p <0,05; ** p <0,01). Se observaron diferencias significativas únicamente en la fracción de Triton X-100 para AS₁₋₄₂.
- 5 Fig. 12: muestra los efectos del tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) en los niveles CSF de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ determinados por ELISA. Los gráficos representan los niveles A β ₁₋₄₀ (izquierda) y A β ₁₋₄₂ (derecha) determinados por ELISA en CSF. Los datos se representan como un gráfico de puntos dispersos en valores individuales (negro) y el promedio \pm SEM. Se marcan los niveles de significación con asteriscos (* p <0,05; ** p <0,01). El tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) a ambas dosis condujo a una disminución significativa de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ en CSF.
- 10 Fig. 13: muestra los efectos del tratamiento en el número de placas en ratones hAPP Tg visualizados con tinción de Tioflavina S. Los gráficos representan el número de placas teñidas con tioflavinas por milímetro cúbico en la corteza y el hipocampo. El tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) redujo la cantidad de placas de forma no dosis dependiente en el hipocampo. Los datos se representan como la media \pm SEM. N = 8 por grupo. * p <0,05; ** p < 0,01.
- 15 Fig. 14: muestra los efectos del tratamiento sobre el área de placas [%] en hAPP Tg de ratones con Tioflavinas: los gráficos representan el área de placa [%] de las placas positivas a Tioflavinas en la corteza y el hipocampo. XG-102 (SEC ID NO: 11) redujo significativamente el área en las placas del hipocampo. Los datos se representan como media \pm SEM. N = 8 por grupo.
- 20 Fig. 15: muestra los resultados de la administración de XG-102 (SEC ID NO: 11) en los niveles de glucosa en sangre, en ayunas (absoluta y relativa) en un modelo animal de diabetes de tipo 2. La glucosa en sangre en ayunas se midió cada tres días hasta el día 68 y en una base regular hasta finalizar en el día 111 en los grupos A y C. Se observó una disminución clara y significativa (p <0,001) en el nivel de glucosa en sangre en ayunas en ratones diabéticos db/db tratados con XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en comparación con el vehículo control. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas de los ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) alcanzaron una meseta baja de aprox. 5 mmol/l. Este efecto fue evidente después de 14 días de dosificación y persistió durante todo el estudio, por tanto durante el período entero que sería desde el día 21 hasta el día 111. En contraste, no se observó ningún efecto de dosis baja de XG-102 (SEC ID NO: 11) (1 mg/kg) durante los 28 días de dosificación.
- 25 Fig. 16: muestra los resultados de la administración de XG-102 (SEC ID NO: 11), 10 mg/kg de peso corporal, en un modelo animal de diabetes de tipo 2. Se observa una prevención clara y significativa (p <0,001) del aumento de peso corporal en ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en comparación con el vehículo control. Este efecto fue evidente desde el día 28 de dosificación y permaneció hasta el día de finalización 111. En contraste, no observamos ningún efecto de dosis baja de XG-102 (SEC ID NO: 11) (1 mg/kg) en el peso corporal durante 28 días de dosificación.
- 30 Fig. 17, 18: muestran el efecto del vehículo o de XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en el modelo animal para diabetes de tipo 2 con ingesta de agua y comida las 24 horas, con medida de orina y heces, en jaulas metabólicas, en el día de estudio 68, de las Figuras 17 (g) y 18 (normalizadas a g de peso corporal). No observamos ningún efecto significativo de XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en ninguno de los parámetros medidos comparados con el vehículo control con una tendencia a la disminución en la ingesta de comida y producción de orina.
- 35 Fig. 19, 20: muestra el efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en el modelo animal para diabetes de tipo 2, a los días 57, 77 y 108, de los niveles de insulina en plasma, MCP-1 y IL-6 en la Fig. 19 y de los niveles en plasma de tPAI-1, TNF y resistina en la Fig. 20; no se observan efectos significativos de XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en ninguno de los parámetros medidos en comparación con el vehículo control, excepto los niveles de resistina en plasma, que fueron significativamente más elevados en los animales tratados con XG-102 (SEC ID NO: 11) el día 77 y 108.
- 40 Fig. 21: muestra el efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en el modelo animal para diabetes tipo 2 sobre el peso del tejido de grasa epididimal, inguinal subcutánea y retroperitoneal en ratas. Se observó una disminución significativa de masa grasa epididimal (p <0,05) y retroperitoneal (p <0,01) en ratones tratados con XG-102 en comparación con el vehículo control.
- 45 Fig. 22: muestra el efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en el modelo animal para diabetes tipo 2 sobre el peso del tejido de cerebro, bazo y corazón. No se observa ningún efecto significativo sobre XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en estos parámetros en comparación con el vehículo control.
- 50 Fig. 23: muestra el efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 11) (10 mg/kg) en el modelo animal para diabetes de tipo 2 sobre el peso de los tejidos de riñón e hígado. Se observa una disminución significativa de masa en el riñón (p <0,05) e hígado (p <0,01) en ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 11) en comparación con el vehículo control.
- 55 Fig. 24: Se incubaron macrófagos cultivados primarios con XG-102 (SEC ID NO: 11) y se lavaron a fondo. La presencia de XG-102 (SEC ID NO: 11) se reveló utilizando un anticuerpo específico contra XG-102. XG-102 está en gran medida incorporado en macrófagos primarios.
- 60
- 65

- 5 Fig. 25: Se trataron ratones por tres vías de administración diferentes (s.c., i.v., i.p.) con péptidos C¹⁴-madiomarcados (1 mg/kg). Los animales fueron sacrificados 72 horas después de la inyección y procesados para inmunorradiografía. Se expusieron secciones sagitales que revelaron la acumulación de péptidos XG-102 en el hígado, bazo y médula ósea predominantemente (XG-102: SEC ID NO: 11).
- 10 Fig. 26: inmunotinción contra XG-102 (SEC ID NO: 11) en el hígado de ratas que habían recibido una inyección i.v. de 1 mg/kg de XG-102. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la inyección. Se reveló cabo utilizando un sustrato DAB. Esta figura muestra de nuevo la acumulación pronunciada de XG-102 en el hígado, y especialmente en las células de Kupffer (macrófagos).
- 15 Fig. 27: muestra la inhibición de la liberación de citoquina y quimiocina en dos líneas celulares. El XG-102 (SEC ID NO: 11) inhibe la liberación de citoquina en líneas celulares tanto mieloides como linfoides, reduciendo la liberación de TNF α , IL-6 y MCP-1 inducida por LPS en células THP-1 (Paneles A-C) y la producción de IFN γ , IL-6 e IL-2 inducida por PMA y ionomicina en células Jurkat (Paneles D-F). El control (XG-101) es menos eficaz debido a su menor estabilidad.
- 20 Fig. 28: muestra la inhibición de la liberación de citoquina en células primarias. La XG-102 (SEC ID NO: 11) también inhibe la liberación de citoquina en células primarias mieloides y linfoides, reduciendo la liberación de TNF α , IL-6 y Rantes inducida por LPS en macrófagos murinos (Paneles A-C) y la producción de TNF α e IFN γ inducida por PMA y ionomicina en células T murinas (Paneles D-E). Se producen efectos a concentraciones no tóxicas de XG-102 (Panel F).
- 25 Fig. 29: muestra la secuencia de ADNc IB1 de rata y su secuencia de aminoácidos prevista (SEC ID NO: 102).
- Fig. 30: muestra la secuencia de proteína IB1 de rata codificada por el límite exón-intrón del donante de corte y empalme de gen rIB1 (SEC ID NO: 103).
- Fig. 31: muestra la secuencia de la proteína IB1 de *Homo sapiens* (SEC ID NO: 104).
- Fig. 32: muestra la secuencia de ADNc IB1 de *Homo sapiens* (SEC ID NO: 105).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de secuencias inhibidoras de JNK

30 Se identificaron secuencias de aminoácido importantes para una interacción eficiente con JNK mediante alineaciones de secuencia entre JBDs de dominio de unión a JNK conocidos. Una comparación de secuencia entre JBDs de IB1 [SEC ID NO: 13], IB2 [SEC ID NO: 14], c-Jun [SEC ID NO: 15] y ATF2 [SEC ID NO: 16] definió una secuencia de 8 aminoácidos débilmente conservados (ver Fig. 1A). Debido a que las JBDs de IB1 e IB2 son aproximadamente 100 veces tan eficientes como las c-Jun o ATF2 en la unión de JNK (Dickens y col., Science 277: 693 (1997), se llegó al razonamiento de que los residuos conservados entre IB1 e IB2 deben ser importantes para permitir la máxima unión. La comparación entre las JBDs de IB1 e IB2 definió dos bloques de siete y tres aminoácidos altamente conservados entre las dos secuencias.

40 Estos dos bloques están contenidos en la secuencia peptídica de 19 aminoácidos en L-IB1(s) [SEC ID NO: 1] y se muestran también por razones comparativas en una secuencia peptídica de 23 aa derivada de IB1 [SEC ID NO: 17]. Estas secuencias se muestran en la Fig. 1B, los trazos en las secuencias L-IB1 indican un hueco en la secuencia con el propósito de alinear los residuos conservados con L-IB1(s).

Ejemplo 2: Preparación de Proteínas de Fusión Inhibidoras de JNK

45 Las proteínas de fusión inhibidoras de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 9 se sintetizaron por unión covalente del extremo C-terminal de la SEC ID NO: 1 al péptido portador largo de 10 aminoácidos N-terminal derivado de HIV-TAT4g 57 (Vives y col., J Biol. Chem. 272: 16010 (1997)) de acuerdo con SEC ID NO: 5 mediante un ligante consistente en dos residuos de prolina. Este ligante se usó para proporcionar una flexibilidad máxima y para prevenir cambios estructurales secundarios no deseados. También se prepararon los constructos básicos, denominándose L-IB1(s) (SEC ID NO: 1) y L-TAT [SEC ID NO: 5], respectivamente.

50 Todos los péptidos retroinversos D de acuerdo con la SEC ID NO: 11 fueron consecuentemente sintetizados. Se prepararon también los constructos básicos y se designaron D-IB1(s) [SEC ID NO: 2] y D-TAT [SEC ID NO: 6], respectivamente.

55 Todos los péptidos de fusión D y L de acuerdo con las SEC ID NO: 9, 10, 11 y 12 se produjeron por síntesis Fmoc clásica y además se analizaron por Espectrometría de Masas. Finalmente, se purificaron mediante HPLC. Para determinar los efectos del ligante de prolina, se produjeron dos tipos de péptidos TAT, uno sin y otro con dos prolinas. La adición de las dos prolinas no pareció modificar la entrada o la localización del péptido TAT en el interior de las células. La Fig. 2 muestra péptidos genéricos con los residuos aminoácidos conservados.

Ejemplo 3: Inhibición de la Muerte Celular por JBD19

Se estudiaron los efectos de la secuencia JBD de 19 aa de longitud de IB1(s) sobre la actividad biológica de JNK. La secuencia de 19 aa se ligó al N-terminal de la Proteína de Fluorescencia Verde (constructo GFP JBD19) y se evaluó el efecto del constructo sobre la apoptosis de células beta-pancreáticas inducida por IL1. Previamente se mostró que este modo de apoptosis era bloqueado por transfección con JBD₁₋₂₈₀ mientras que inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 conocidos en la materia no lo protegieron.

Los oligonucleótidos correspondientes a JBD19 y que comprenden una secuencia conservada de 19 aminoácidos así como también una secuencia mutada en las regiones completamente conservadas fueron sintetizados e insertados direccionalmente en los sitios EcoRI y Sall del vector pEGFP-N1 que codifica para la Proteína Fluorescente Verde (GFP) (de Clontech). Las células TC-3 productoras de insulina fueron cultivadas en un medio RPMI 1640 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal, 100 µg/ml de estreptomina, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM de glutamina. Las células TC-3 productoras de insulina fueron transfectadas con los vectores indicados y se agregó IL-1 (10 ng/ml) al medio de cultivo. La cantidad de células apoptóticas se contó 48 horas después de la adición de IL-1 con un microscopio de fluorescencia invertido. Las células apoptóticas fueron discriminadas de las células normales por el característico "burbujeo" del citoplasma y se contaron después de dos días.

GFP es el vector de expresión de Proteína Fluorescente Verde que se usa como control. JBD19 es el vector que expresa un GFP quimérico ligado a la secuencia de 19 aa derivada del JBD de IB1; JBD19Mut es el mismo vector que GFP-JBD19, pero con un JBD mutado de cuatro residuos conservados que se muestran en la Fig.; y JBD₁₋₂₈₀ es el vector GFP ligado al JBD entero (aa 1-280). El GFP-JBD19 que expresa el constructo previno la apoptosis de células pancreáticas inducida por IL-1 tan eficientemente como JBD₁₋₂₈₀ entero.

Como controles adicionales, las secuencias mutadas en IB1(s) completamente conservadas presentaban una capacidad enormemente disminuida para evitar la apoptosis.

Ejemplo 4: Importación Celular de Péptidos TAT-IB1(s)

Se evaluó la capacidad de las formas enantioméricas L-y D- de TAT y los péptidos TAT-IB1(s) ("péptidos TAT-IB") para entrar en las células. L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1(s) y los péptidos D-TAT-IB1(s) [SEC ID NO: 5, 6, 9 y 12, respectivamente] fueron marcados por adición N-terminal de un residuo de glicina conjugado con fluoresceína. Se agregaron los péptidos marcados (1 µM) a cultivos de células TC-3, que se mantuvieron tal como se describió en el Ejemplo 3. En tiempos predeterminados, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante cinco minutos en metanol-acetona enfriada con hielo (1:1) antes de ser examinadas bajo un microscopio de fluorescencia. Como control se usó BSA marcado con fluoresceína (1 µM, 12 mol/mol BSA). Los resultados demostraron que todos los péptidos anteriores marcados con fluoresceína habían entrado en las células de forma eficiente y muy rápida (en menos de cinco minutos) una vez agregados al medio de cultivo. A la inversa, la seroalbúmina bovina marcada con fluoresceína (1 µM BSA, 12 mol fluoresceína/mol BSA) no penetró en las células.

Un estudio temporal indicó que la intensidad de la señal fluorescente para los péptidos L-enantioméricos disminuye en un 70% después de un período de 24 horas. A las 48 h había poca o ninguna señal. Por el contrario, D-TAT y D-TAT-IB1(s) eran extremadamente estables en el interior de las células.

Las señales fluorescentes de estos péptidos retroinversos todos D fueron aún más fuertes una semana después, disminuyendo la señal ligeramente sólo a las dos semanas tras el tratamiento.

Ejemplo 5: Inhibición *in vitro* de c-JUN, Fosforilación de ATF2 y Elk1

Se investigaron *in vitro* los efectos de los péptidos sobre la fosforilación mediada por JNK de sus factores de transcripción diana. Los JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes y no activados se produjeron mediante un kit de lisado de reticulocitos de conejo TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (Promega) y se usaron ensayos de quinasa en fase sólida con c-Jun, ATF2 y Elk1 como sustratos, solos o fusionados con glutation-S-transferasa (GST). Se llevaron a cabo estudios dosis-respuesta donde se mezclaron L-TAT o los péptidos L-TAT-IB1(s) (0-25 µM) con las quinasas JNK1, JNK2 o JNK3 recombinantes en un tampón de reacción (20 mM de Tris-Acetato, 1 mM de EGTA, 10 mM de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP), 5 mM de pirofosfato de sodio, 10 mM de p-glicerofosfato, 1 mM de ditiotreitolo) durante 20 minutos. Las reacciones de quinasa se iniciaron luego mediante la adición de MgCl₂ 10 mM y 5 pCi ³³P-γ-dATP y 1 µg de cualquiera de GST-Jun (aa 1-89), GST-AFT2 (aa 1-96) o GST-ELK1 (aa 307-428). Las proteínas de fusión GST se adquirieron de Stratagene (La Jolla, CA).

También se agregaron a la mezcla 10 µl de granulado de glutation-agarosa. Luego se separaron los productos de reacción por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% desnaturalizado. Los geles fueron secados y entonces expuestos a películas de rayos X (Kodak). Se observó una inhibición temprana completa de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 mediante JNK con dosis de péptidos TAT-IB(s) tan bajas como de 2,5 µM. Sin embargo, una notable excepción fue la ausencia de la inhibición de TAT-IB(s) de la fosforilación JNK3 de Elk1. En general, los péptidos

TAT-IB1(s) mostraron buenos efectos para inhibir la fosforilación en la familia JNK de sus factores de transcripción diana. La capacidad de los péptidos D-TAT, D-TAT-IB1(s) y L-TAT-IB1(s) (estudio de dosificación 0-250 μM) para inhibir la fosforilación de GST-Jun (aa 1-73) mediante JNK1, JNK2, y JNK3 recombinante fueron analizados tal como se describió anteriormente. En general, el péptido D-TAT-IB1(s) disminuyó la fosforilación intermediada por JNK de c-Jun, pero a niveles aproximadamente 10-20 veces menos eficientes que L-TAT-IB1(s).

Ejemplo 6: Inhibición de la Fosforilación c-JUN mediante JNK activados

Los efectos de los péptidos L-TAT o L-TAT-IB1(s) tal como se definen aquí sobre JNK activados por estímulos de estrés fueron evaluados usando GST-Jun para disminuir el JNK en células HeLa irradiadas con luz UV o en células PTC tratadas con IL-1. Las células PTC fueron cultivadas tal como se describió anteriormente. Las células HeLa fueron cultivadas en un medio de DMEM suplementado con 10% de Suero de Ternera Fetal, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin, 100 unidades /ml de penicilina y 2 mM de glutamina. Una hora antes de usar la preparación de extracto celular, las células PTC fueron activadas con IL-1 tal como se describió anteriormente, mientras que las células HeLa fueron activadas con luz UV (20 J/m^2). Se prepararon extractos celulares a partir del control, de las células HeLa irradiadas con luz UV y de las células TC-3 tratadas con IL-1 mediante raspado de los cultivos en un tampón de lisis (20 mM de Tris-acetato, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100, 10 mM de p-fosfato de nitrofenilo, 5 mM de pirofosfato de sodio, 10 mM de glicerofosfato, 1 mM de ditiotreitól). Los residuos se retiraron por centrifugación durante 5 minutos a 15.000 rpm en un rotor Beckman SS-34. Se incubaron extractos de 100 μg durante una hora a temperatura ambiente con 1 μg de GST-jun (aminoácidos 1-89) y 10 μl de granulado de glutation-agarosa (Sigma). Después de cuatro lavados con el tampón de raspado, el granulado se resuspendió en el mismo tampón suplementado con péptidos L-TAT o péptidos L-TAT-IB1(s) (25 μM) durante 20 minutos. Luego se iniciaron reacciones quinasa por adición de 10 mM de MgCl_2 y 5 pCi ^{33}P -gamma-dATP y se incubaron durante 30 minutos a 30°C.

Entonces se separaron los productos de reacción mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida desnaturalizado al 10%. Los geles se secaron y se expusieron a películas de rayos X (Kodak). Los péptidos TAT-IB(s) evitaron eficientemente la fosforilación de c-Jun mediante la activación de JNK activado en estos experimentos.

Ejemplo 7: Inhibición *In vivo* de la fosforilación c-JUN mediante los péptidos TAT-IB(s) tal como se define aquí

Para determinar si los péptidos permeables a las células aquí definidos podrían bloquear la señalización de JNK *in vivo*, se usó un sistema GAL4 heterólogo. Células HeLa cultivadas tal como se ha descrito anteriormente fueron co-transfectadas con el vector reporter 5xGAL-LUC junto con el constructo de expresión GAL-Jun (Stratagene) que comprende el dominio de activación de c-Jun (aminoácidos 1-89) ligados al dominio de unión GAL4 ADN. La activación de JNK se logró mediante co-transfección de vectores que expresan las quinasas MKK4 y MKK7 aguas arriba (ver Whitmarsh y col., Science 285: 1573 (1999)). Resumiendo, se transfectaron 3×10^5 células con los plásmidos en placas de 3,5-cm usando DOTAP (Boehringer Mannheim) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los experimentos que implican GAL-Jun, se transfectaron 20 ng del plásmido con 1 μg del plásmido reporter pFR-Luc (Stratagene) y 0,5 μg de cualquiera de los plásmidos de expresión MKK4 o MKK7. Tres horas después de la transfección, se cambiaron los medios celulares y se agregaron los péptidos TAT y TAT-IB1(s) (1 μM). Se midió la actividad de luciferasa 16 horas después utilizando el "Sistema Informante Dual" de Promega después de normalización del contenido en proteína. La adición del péptido TAT-IB1(s) bloqueó la activación de c-Jun tras la activación intermediada por MKK4 y MKK7 de JNK. Debido a que las células HeLa expresan las isoformas JNK1 y JNK2 pero no la JNK3, se transfectaron células con JNK3. Nuevamente el péptido TAT-IB(s) inhibió la activación de c-Jun mediada por JNK2.

Ejemplo 8: Síntesis de los péptidos IB(s) retroinversos, todos D y variantes de los mismos

Los péptidos de la invención pueden ser péptidos todo aminoácido-D sintetizados a la inversa para evitar la proteólisis natural (es decir, péptidos retroinversos todo D). Un péptido retroinverso todo D de la invención proporcionará un péptido con propiedades funcionales similares a las del péptido nativo, correspondiendo los grupos secundarios de los aminoácidos componentes a la alineación del péptido nativo pero reteniendo una estructura resistente a la proteasa.

Los péptidos retroinversos de la invención son análogos sintetizados mediante el uso de aminoácidos-D por unión de los aminoácidos en una cadena peptídica de forma que la secuencia de aminoácidos del análogo peptídico retroinverso es exactamente la opuesta a la del péptido seleccionado que sirve como modelo. Con propósitos ilustrativos: si la proteína TAT que ocurre en forma nativa (formada por aminoácidos-L) tiene la secuencia GRKKRRQRRR [SEC ID NO: 5], el análogo peptídico retroinverso de este péptido (formado por aminoácidos-D) tendría la secuencia RRRQRRKKRG [SEC ID NO: 6]. Los procedimientos para sintetizar una cadena de aminoácidos-D para formar péptidos retroinversos son conocidos en la técnica (ver por ejemplo Jameson y col., Nature, 368,744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368,692-693 (1994); Guichard y col., J. Med. Chem. 39, 2030-2039 (1996)). Específicamente, los retro péptidos de acuerdo con las SEC ID NO 2, 4, 6, 8, 11-12, 18, 20, 22 y 25-26

se obtuvieron por síntesis F-mock clásica y fueron luego analizados por espectrometría de masas. Finalmente se purificaron por HPLC.

- 5 Debido a que un problema inherente a los péptidos nativos es la degradación por las proteasas naturales e inmunogenicidad, los compuestos heterodivalentes o heteromultivalentes de esta invención se prepararon de manera que incluyen el "isómero retroinverso" del péptido deseado. Así, protegiendo el péptido de la proteólisis natural, debería incrementarse la eficacia del compuesto heterodivalente o heteromultivalentemente, tanto prolongando la vida media como disminuyendo la respuesta inmunitaria que apunta a destruir activamente los péptidos.

Ejemplo 9: Actividad Biológica a largo plazo de los Péptidos IB(s) retroinversos todo D y sus variantes

- 10 La actividad biológica a largo plazo se calcula para el heteroconjugado peptídico que contiene D-TAT-IB(s) retroinverso (ver las secuencias quiméricas anteriores) en comparación con el análogo de aminoácido-L nativo debido a la protección del péptido D-TAT-IB(s) contra la degradación causada por las proteasas naturales, tal como se muestra en el Ejemplo 5.

- 15 Se analizó la inhibición de IL-1 inducida por la muerte de células beta pancreáticas mediante el péptido D-TAT-IB1(s). Se incubaron células TC-3 tal como se describió anteriormente durante 30 minutos con una sola adición de los péptidos indicados (1 μ M) y luego se agregó IL-1 (10 ng/ml).

Se contaron las células apoptóticas después de dos días de incubación con IL-1 empelando yoduro de propidio y tinción nuclear Hoechst 33342. Se contaron como mínimo 1.000 células para cada experimento. Se indica el error estándar de la media (SEM), n=5. El péptido D-TAT-IB1 disminuyó la apoptosis inducida por IL-1 hasta un grado similar al de los péptidos L-TAT-IB.

- 20 Se analizó también la inhibición a largo plazo de la muerte celular inducida por IL-1 mediante el péptido de D-TAT-IB1. Se incubaron células TC-3 como anteriormente durante 30 minutos con una sola adición de los péptidos indicados (1 μ M) y luego se agregó IL-1 (10 ng/ml), seguido de adición de citoquina cada dos días. Se contaron las células apoptóticas después de 15 días de incubación con IL-1 empleando yoduro de propidio y tinción nuclear con Hoechst 33342. Cabe observar que una sola adición del péptido TAT-IB1 no confiere protección a largo plazo. Se contaron como mínimo 1.000 células para cada experimento. Como resultado, D-TAT-IB1(s), pero no L-TAT-IB1(s), fueron capaces de conferir protección a largo plazo (15 días).
- 25

Ejemplo 10: Supresión de los Factores de Transcripción de JNK mediante los péptidos L-TAT-IB1(s) tal como se usan en la presente invención

- 30 Se llevaron a cabo ensayos de retardo de gel con una sonda AP-1 doblemente marcada (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3' (SEC ID NO: 101). Se trataron o no extractos nucleares de células HeLa durante una hora con 5 ng/ml TNF- α , tal como se ha indicado. Los péptidos TAT y L-TAT-IB1(s) usados de acuerdo con la presente invención se agregaron 30 minutos antes de TNF-alfa. Se muestra únicamente la parte del gel con el complejo específico AP-1 ADN (tal como se demuestra con experimentos competitivos con competidores no específicos y específicos no marcados).

- 35 Los péptidos L-TAT-IB1(s) usados de acuerdo con la presente invención disminuyeron la formación del complejo de unión AP-1 ADN en presencia de TNF-alfa.

Ejemplo 11: Inhibición de la actividad de JNK endógeno en células HepG2 usando una realización "todo en un pocillo" (ver Figura 3)

- 40 Se sembraron células HepG2 a razón de 3.000 células/pocillo el día anterior al experimento. Luego, (a) se agregaron concentraciones crecientes de cualquiera de interleucina-1 [IL-1 beta (■)] o del factor de necrosis tumoral [TNFalfa (●)] para activar JNK durante 30 minutos. Se lisaron células en 20 mM de Hepes, 0,5% de Tween, pH 7,4 y se procesaron por AlfaScreen JNK; (b) Z' para medir la actividad de JNK inducida por 10 ng/ml de IL-1 en una placa de 384 pocillos/placa (n=96); (c) inhibición de la actividad endógena de JNK inducida por IL-1beta con inhibidores JNK químicos [estaurosporina (°) y SP600125 (●)]; (d) efecto de los inhibidores peptídicos L-TAT-IB1(s) de acuerdo con la SEC ID NO: 9 [aquí abreviado como L-JNKi (■)] y D-TAT-IB1(s) de acuerdo con la SEC ID NO: 11 (abreviada aquí como D-JNKi (□)) y JBDs (●) (corresponde a L-JNKi sin la secuencia TAT)] en actividad JNK-dependiente de IL-1. Todos los paneles son representativos de tres experimentos independientes (n=3).
- 45

Métodos: Ensayo de quinasa Alphascreen

- 50 *Principio:* AlphaScreen es una tecnología a base de granulado no radioactivo que se usa para estudiar las interacciones biomoleculares en formato de microplaca. El acrónimo ALPHA significa Ensayo Homogéneo de Proximidad de Luminiscencia Amplificada. Implica una interacción biológica que lleva a un granulado "dador" y uno "aceptor" en proximidad y luego se produce una cascada de reacciones químicas para generar una señal amplificada. Mediante excitación láser a 680 nm, un fotosensibilizador (ftaloxianina) en el granulado "dador"

convierte el oxígeno ambiental a un estado de singlete excitado. Durante su vida media de 4 μ s, la molécula de oxígeno singlete puede difundirse hasta aproximadamente 200 nm en la solución y si, hay un granulado aceptor en la proximidad, el oxígeno singlete reacciona con un derivado tioxeno del granulado “aceptor”, generando una quimioluminiscencia a 370 nm que activa adicionalmente los fluoróforos contenidos en el mismo granulado “aceptor”.

5 Los fluoróforos excitados emiten luz a 520 – 620 nm. En ausencia de un granulado aceptor, el oxígeno singlete baja hasta un estado base y no se produce ninguna señal.

10 Los reactivos quinasa (B-GST-cJun, anticuerpo anti-P-cJun y JNK3 activo) fueron diluidos primero en tampón quinasa (20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100 μ M de Na_3VO_4 , 0,01% Tween-20) y fueron agregados a los pocillos (15 μ l). Luego las reacciones se incubaron en presencia de 10 μ M de ATP durante 1h a 23°C. La detección se llevó a cabo mediante adición de 10 μ l de una mezcla de gránulos (aceptor Proteína A 20 μ g/ml y dador estreptavidina 20 μ g/ml), diluida en tampón de detección (20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 20 mM de NaCl, 80 mM de EDTA, 0,3% BSA), seguido de una hora más de incubación a 23°C en oscuridad. Para medir la actividad endógena de JNK, se llevaron a cabo ensayos con quinasa tal como se describieron anteriormente, excepto que se reemplazaron los JNK 3 activos por lisados de células y los componentes de quinasa de reacción se agregaron después de la lisis celular. Se usaron anticuerpos B-GST-cjun y P-cJun a estas mismas concentraciones, mientras que para el ATP se usó 50 μ M en lugar de 10 μ M. La señal AlphaScreen fue analizada directamente en el aparato Fusion o En Vision.

Ejemplo 12: Determinación de la actividad de los péptidos IB(s) retroinversos todo D y sus variantes en el tratamiento de infecciones virales por el virus de la varicela Zoster (VZV)

20 La determinación de la actividad de los péptidos IB(s) y todos los péptidos IB(s) retroinversos todos D que se usan con la presente invención fueron ensayados con el péptido inhibidor XG102 de JNK (SEC ID NO: 11) como compuesto de ensayo en células huésped cultivadas (fibroblastos de prepucio humano (HFFs)). Los virus son parásitos intracelulares estrictos que requieren un ambiente celular funcional para completar su ciclo de vida; las células que mueren no apoyan la replicación de virus. Adicionalmente, los inhibidores de las funciones celulares pueden ser tóxicos para las células, y podrían bloquear no específicamente el crecimiento viral. Por tanto, las células huésped enfermas o moribundas podrían exhibir valores virales no específicamente reducidos. Debido a que esto podría falsificar los resultados, primero se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad para determinar la tolerancia de las células cultivadas a un compuesto de ensayo. Entonces se llevó a cabo un ensayo de reducción en placas y se ensayó la actividad del péptido XG-102 inhibidor de JNK (SEC ID NO: 11) con respecto al Virus Zoster Viral (VZV) en células infectadas.

A) Determinación de la citotoxicidad de los péptidos IB(s) retroinversos todos D:

35 Para determinar la toxicidad, se sembraron células cultivadas (fibroblastos de prepucio humano (HFFs)) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Se agregó un medio que contenía DMSO (mismo nivel que 5 μ M XG-102 (SEC ID NO: 11)), o XG-102 (SEC ID NO: 11), a varias concentraciones (1, 2, y 5 μ M) durante 24 h. Entonces se llevó a cabo un ensayo Rojo Neutro. Los ensayos colorimétricos Rojo Neutro para los ensayos de citotoxicidad (en grupos de 6 réplicas) se usaron para establecer la dosis máxima para los ensayos de eficiencia subsiguientes (que se llevan a cabo en Taylor y col., 2004, J. Virology, 78:2853-2862). Las células vivas absorben el rojo neutro y, por consiguiente, el nivel de absorbancia es una medida cuantitativa de la viabilidad y del número de células. La absorción de Rojo Neutro es directamente proporcional a la cantidad de células y refleja también una endocitosis normal. Por tanto, se agregó una pizca de Rojo Neutro al medio a las 0 o 24 horas. Después de fijación y extracción, se agregó el tinte y la cantidad de tinte de cada muestra se midió en un vector de placas ELISA a 540 nm (ver Fig. 4). No se observó toxicidad con ninguna cantidad de XG-102 (SEC ID NO: 11) y el crecimiento de células no se restringió en comparación con el diluyente DMSO solo (control). Por tanto, la concentración standard de 1 μ M no tuvo efectos evidentes sobre las células HFF y serían bien toleradas dosis más altas.

45 B) Ensayo de reducción de placas para evaluar los efectos antivirales de XG-102 (SEC ID NO: 11) contra el virus de la varicela-zoster (VZV)

50 Para determinar si XG-102 (SEC ID NO: 11) tenía un efecto antiviral dependiente de la dosis, se ensayó un rango de concentraciones cercanas a la dosis estándar de 1 μ M. En este ensayo de reducción de placas, se inocularon fibroblastos de prepucio humano confluentes (HFFs) en placas de 24 pocillos con HFFs infectados con VZV en una relación de 1:100 (multiplicidad de infección MOI = 0,01) y se absorbieron en las células durante 2 horas. El exceso de virus se eliminó y se agregó medio que contenía 0 (DMSO únicamente), 0,5, 1, o 2 μ M XG-102 (SEC ID NO: 11). Se recogió una muestra en ese momento para medir el nivel inicial de infección; donde cada pocillo contenía ~150 pfu. Después de 24 horas, se tripsinizaron los pocillos por duplicado y luego se valoraron las suspensiones de células en monocapas de células MeWo por triplicado para determinar la cantidad de células infectadas con VZV en cada muestra. Durante el crecimiento no restringido, VZV usualmente aumentó 10 veces durante un día debido a que se propagó por diseminación célula-célula. Esto es lo que se observó para los cultivos tratados con DMSO solamente, que proporcionaron 1200 \pm 430 pfu (Fig. 5). Los resultados de la determinación fueron los siguientes:

XG-102 (SEC ID NO: 11)	Diseminación de VZV (pfu) \pm SD
0 μ M (DMSO)	1233 \pm 432
0,5 μ M	260 \pm 53
1,0 μ M	212 \pm 48
2,0 μ M	312 \pm 79

Así, XG-102 (SEC ID NO: 11) tenía un fuerte efecto antiviral en todas las concentraciones ensayadas con VZV en rendimientos cercanos a 200-300 pfu. Usando el gráfico de estos resultados para interpolar la EC_{50} , se calculó que aproximadamente 0,3 μ M XG-102 (SEC ID NO: 11) hacían que disminuyera el VZV en un 50%.

- 5 En base a los datos de citotoxicidad y eficacia, se calculó un índice preliminar selectivo (Tox/EC_{50}) de 5,0 μ M/0,3 μ M que proporcionó un valor de \sim 17, donde el verdadero SI se consideró aún superior debido a que la concentración de XG-102 (SEC ID NO: 11) ni siquiera se acercó a aquel de la muerte del 50% de las células.

C) Medida de la replicación de virus varicela zoster (VZV) en fibroblastos de prepucio humano (HFFs) con XG-102 (SEC ID NO: 11)

- 10 Para determinar la dosis eficaz mínima de XG-102 que evita la replicación del virus de la varicela-zoster (VZV) en fibroblastos de prepucio humano (HFFs) con XG-102 (SEC ID NO: 11), se inocularon monocapas confluentes de HFFs con la cepa VZV-BAC-Luc durante 2h y luego se trataron durante 24 horas con XG-102 (SEC ID NO: 11) a concentraciones de 0,25, 0,5, o 1,0 μ M o con el control negativo (XG-100, 1,0 μ M). Se midió la producción viral mediante un ensayo de luciferasa. Las muestras estaban por triplicado y se muestra la luminiscencia promedio; las barras de error representan la desviación estándar del promedio.

- 15 Como resultado, la replicación de VZV fue normal en presencia del control negativo (el péptido Tat solo). XG-102 (SEC ID NO: 11) evitó la replicación de VZV en la concentración más baja ensayada de 0,25 μ M. La dosis efectiva mínima no pudo ser determinada en este experimento. Aunque no se sabe todavía por qué VZV depende de la actividad de JNK durante la infección, parece ser un requisito crítico para esta enzima. Una baja concentración, de 0,25 μ M, de XG-102 (SEC ID NO: 11) es por tanto suficiente para bloquear completamente la diseminación de VZV en el cultivo. Una posible explicación para este efecto es que esta cantidad de XG-102 (SEC ID NO: 11) se une a todas las moléculas de JNK en las células infectadas. Alternativamente, 0,25 μ M XG-102 (SEC ID NO: 11) puede reducir la actividad de JNK por debajo de un nivel de umbral que es óptimo para la replicación de VZV. Los resultados de este experimento se resumen en la Fig. 6.

25 **Ejemplo 13: Determinación de la actividad de los péptidos IB(s) RetroInversos todo D y sus variantes en el tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)**

- 30 Para determinar la actividad de los ejemplos de los XG-102 peptídicos IB(s) todo D (SEC ID NO: 11) en el tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se usó XG-102 (SEC ID NO: 11) en un modelo animal de fibrosis e inflamación pulmonar aguda inducida por bleomicina. El protocolo de la fibrosis e inflamación inducida por bleomicina ya ha sido descrito en la literatura. El propósito del experimento fue investigar el efecto de XG-102 (SEC ID NO: 11) vía subcutánea (s.c.) sobre el reclutamiento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar (BAL) y fibrosis e inflamación inducida por bleomicina:

- en el día 1 después de una sola administración de bleomicina (10 mg/kg),
- y en el día 10 con el desarrollo de fibrosis

35 1) *Método y realización experimental*

- 40 El compuesto de ensayo XG-102 (SEC ID NO: 11) a dos dosis y un control de vehículo se administraron s.c. con una única administración intranasal de bleomicina y se analizaron los ratones después de 1 y 10 días. Los animales que se usaron en el modelo eran ratones 10 C57BL/6 (de 8 semanas de vida) por grupo. Los grupos experimentales incluyeron vehículo, 0,001 mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11) y 0,1 mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11), y el tratamiento consistía en una administración subcutánea repetida de XG-102 (SEC ID NO: 11) antes de la administración de bleomicina y luego cada 3 días. Se monitoreó la inflamación pulmonar aguda a las 24 horas mediante lavado con BAL, citología, recuento celular y actividad de mieloperoxidasa pulmonar. El efecto del compuesto se comparó con los vehículos control. La fibrosis pulmonar se verificó histológicamente usando una tinción de hematoxilina y eosina a los 10 días después de la dosis única de bleomicina.

45 1.1) *Administración de bleomicina*

Se administró sulfato de bleomicina en solución salina (10 mg/kg de peso corporal) de Bellon Laboratories (Montrouge, Francia) a través de las vías respiratorias por instilación nasal a un volumen de 40 μ l bajo ligera anestesia de cetamina-xilasina. Los grupos de administración de bleomicina tanto para la inflamación inducida por bleomicina como para la fibrosis incluían: vehículo, 0,001 mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11) y 0,1 mg/kg XG-102 (SEC

ID NO: 11). La vía para la inflamación inducida por bleomicina era la vía subcutánea (s.c.) y la administración se efectuó en una dosis única. La vía para fibrosis inducida por bleomicina era subcutánea (s.c.) y la administración se efectuó 3 veces en 10 días.

1.2) Lavado broncoalveolar fluido (BALF)

5 Después de una incisión en la tráquea, se insertó una cánula plástica y los espacios aéreos se lavaron usando 0,3 ml de solución de PBS calentada a 37°C. Las muestras recogidas se dispensaron en dos fracciones: la primera (1 ml que correspondía a los dos primeros lavados) se usó para medir el mediador y la segunda para determinar las células (4ml). La primera fracción se centrifugó (600 g durante 10 min) y el sobrenadante se fraccionó y se mantuvo a -80°C hasta la determinación del mediador. El granulato de células se resuspendió luego en 0,4 ml de NaCl estéril al 0,9%, y se reunió con la segunda fracción y se usó para el recuento de células.

1.3) Homogeneización Pulmonar

15 Después de BAL, se extrajo el pulmón entero y se colocó en el interior de un microtubo (Lysing matrix D, Q Bio Gene, Illkrich, Francia) con 1 ml de PBS, se preparó un extracto total de tejido de pulmonar usando un sistema Fastprep® (FP120, Q Bio Gene, Illkrich, Francia), luego se centrifugó el extracto y el sobrenadante se almacenó a -80°C antes de la medición del mediador y del ensayo de colágeno en Ensayo Sircol Collagen (Francia Biochem Division, Francia).

1.4) Recuento y determinación de células

20 El recuento total de células se determinó en fluido de BAL usando un hemocitómetro Malassez. Se efectuaron recuentos diferenciales de células en preparaciones de citospina (Cytospin 3, Thermo Shandon) después de tinción con MGG Diff-quick (Dade Behring AG). Se efectuaron recuentos diferenciales de células en 200 células usando criterios morfológicos convencionales.

1.5) Medición de TNF

El nivel de TNF en BALF se determinó usando equipos de ensayo ELISA (sistema Mouse DuoSet, R&D system, Minneapolis, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se dan en pg/ml.

25 1.6) Medición de MPO

Los niveles de MPO se midieron por administración de XG-102. El MPO no fue inducido significativamente después de la bleomicina en este experimento. Además, el XG-102 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de MPO en el pulmón.

1.7) Histología

30 Después de BAL y perfusión de pulmón, el lóbulo grande se fijó en formaldehído a pH tamponado al 4% para análisis microscópicos convencionales. Se tiñeron secciones de 3-µm con hematoxilina y eosina (H&E).

2) Resultados

A) Primer Estudio: La Bleomicina (BLM) indujo inflamación aguda en el pulmón

35 Grupos: Vehículo, XG-102 (SEC ID NO: 11) 0,001 mg/kg y XG-102 (SEC ID NO: 11) 0,1 mg/kg
Vía: vía s.c., dosis única

a) Reclutamiento celular en el espacio broncoalveolar lavado

40 A 0,1 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) reduce significativamente el reclutamiento de neutrófilos y la cantidad total de células reclutadas durante la etapa inflamatoria. A 0,001 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) no tiene ningún efecto sobre el reclutamiento de neutrófilos u otros tipos de células en el espacio broncoalveolar (un experimento representativo con n = 5 ratones por grupo; *p < 0,05; **p < 0,001).

b) Reclutamiento de células en pulmón usando MPO en homogeneizado depulmón

45 La mieloperoxidasa (MPO) cumple una función importante en los sistemas de defensa del huésped. Esta proteína de 140 kDa, compuesta por dos cadenas pesadas de 53 kDa y dos cadenas ligeras de 15 kDa, fue descubierta en 1960. La liberación de MPO a partir de gránulos de neutrófilos y monocitos en respuesta a la activación de leucocitos permite la conversión de peróxido de hidrógeno e iones cloruro a ácido hipocloroso (HOCl), que es un fuerte agente oxidante. Aunque la MPO cumple una importante función en el sistema de defensa, varios estudios demuestran que la MPO cumple también una función en varios trastornos inflamatorios, donde se ha informado de

un nivel elevado de MPO, por ejemplo en enfermedades de la arteria coronaria. Además, los niveles de MPO en los tejidos revelan el estado de activación de los neutrófilos y proveen una indicación sobre la infiltración de neutrófilos en el tejido.

- 5 En el presente experimento, la MPO no fue inducida significativamente después de la administración de bleomicina. XG-102 (SEC ID NO: 11) no tuvo por tanto ningún efecto sobre los niveles de MPO en el pulmón (ver Fig. 7).

c) Medición de TNF

Al medir los niveles de TNF se observó una tendencia a la reducción del nivel de TNF en BALF después de la administración de XG-102 (SEC ID NO: 11), aunque los niveles de TNF fueron muy bajos después de administración de BLM (ver Fig. 8).

10 *d) Conclusión*

Pudo observarse que a 0,1 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) disminuye el reclutamiento de neutrófilos y de células totales en el espacio broncoalveolar y se induce una tendencia a disminuir el nivel de TNF. Además, el estudio de las platinas histológicas mostró una disminución de la acumulación de células inflamatorias en el espacio peribronquial. Por tanto puede llegarse a la conclusión de que el XG-102 (SEC ID NO: 11) reduce la inflamación inducida por Bleomicina.

De acuerdo con los resultados el experimento se llevó a cabo adicionalmente en un modelo de fibrosis.

B) Segundo estudio: Bleomicina (BLM) inducida por fibrosis pulmonar

Grupos: Vehículo, XG-102 (SEC ID NO: 11) 0,001 mg/kg y XG-102 (SEC ID NO: 11) 0,1 mg/kg
Vía: vía s.c. 3 veces en 10 días.

20 *a) Reclutamiento de células en el espacio broncoalveolar lavado*

A 0,001 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) se redujeron significativamente el reclutamiento de linfocitos y la cantidad de células totales reclutadas durante la etapa inflamatoria caracterizada en ese punto por el reclutamiento de linfocitos. A 0,1 mg/kg, XG-102 (SEC ID NO: 11) no tuvo ningún efecto (n= 5 ratones por grupo; *p < 0,05; **p < 0,001) (ver Fig. 9).

25 *b) Histología*

Secciones de 3 µm de pulmones se tiñeron con hematoxilina y eosina. La acumulación de células inflamatorias, las áreas fibróticas, la pérdida de arquitectura pulmonar se observaron 10 días después de la administración de BLM. Se observó una disminución de estos parámetros después de la administración de XG-102 en dosis bajas (0,001 mg/kg) pero no con la dosis más alta (0,1 mg/kg) (ver Figura 10).

30 *c) Conclusión*

Puede llegarse a la conclusión de que XG-102 (SEC ID NO: 11) administrada 3 veces en dosis bajas de 0,001 mg/kg disminuye la inflamación posterior inducida por Bleomicina, en particular el reclutamiento de linfocitos observado en ese momento. Además, la sustancia de ensayo administrada tres veces en esta dosis atenúa la fibrosis inducida por bleomicina. Pudieron observarse áreas fibróticas menos extendidas con una estructura pulmonar más conservada.

35 **Ejemplo 14: Determinación de la actividad de los péptidos IB(s) retroinversos todo D y sus variantes en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

Para determinar la actividad del péptido XG-102 IB(s) retroinverso todo-D (SEC ID NO: 11) en la enfermedad de Alzheimer, se evaluó XG-102 (SEC ID NO: 11) en el modelo de ratón transgénico hAPP que hiperexpresa APP751 con mutaciones London y Swedish usando el ensayo de Laberinto de Agua Morris sobre conductismo, así como también ensayos inmuno-histológicos que miden la carga de placas y ensayos ELISA para medir los niveles β-amiloides₁₋₄₀ y β-amiloides₁₋₄₂ en el cerebro de ratones.

a) METODOS

i) Introducción

45 El estudio fue diseñado para evaluar la eficacia de la sustancia de ensayo (XG-102, SEC ID NO: 11) en marcadores de conductismo, bioquímicos e histológicos, usando ratones hembra hAPP Tg de 5 meses (±2 semanas) de vida. Así, los ratones fueron tratados cada dos o tres semanas hasta los cuatro meses y al finalizar el período de tratamiento se evaluó el comportamiento mediante el Laberinto de Agua Morris. Al sacrificar el cerebro, se

recogieron CSF y sangre. Los niveles de A β 40 y A β 42 se determinaron en cuatro fracciones diferentes de homogeneizado de cerebro, así como también en CSF de ratones Tg. La carga de placa se cuantificó en la corteza y en el hipocampo de 8 animales Tg por grupo de tratamiento.

ii) Animales

5 Ratones Tg hembra de origen C57BL/6xDBA y una edad de 5 meses (\pm 2 semanas) fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento 1 a 3 (n = 12). Los animales fueron sometidos a administración de vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 11) en dos concentraciones diferentes a partir de los 5 meses de vida y se continuó hasta 4 meses con aplicaciones subcutáneas (s.c.) cada segunda o tercera semana. Todos los animales que se usaron para el presente estudio tenían ojos oscuros y probablemente eran susceptibles de percibir los hitos fuera de la pileta de MWM. Sin embargo, hubo que excluir que las capacidades visuales de un animal fueran malas, lo cual fue controlado en la plataforma de entrenamiento visible, en lo que se denomina pre-ensayo, antes de iniciar el tratamiento para todos los animales, incluyendo los de reserva comprendidos en el estudio. En caso de detectar un defecto de visión en un animal específico, el ratón habría sido excluido del estudio.

iii) Identificación y Alojamiento del Animal

15 Los ratones fueron identificados individualmente por marcas en las orejas. Fueron alojados en jaulas individuales ventiladas (IVCs) en lechos para roedores standardizados, provistos por Rettenmaier®. Cada jaula contenía un máximo de cinco ratones. Los ratones se mantuvieron siguiendo los procedimientos de JSW Standard Operating Procedures (SOP GEN011) que están escritos en base a modelos Internacionales. Cada jaula fue identificada con una tarjeta de un color que indicaba el número del estudio, el sexo, los números de registro individuales (IRN) de los animales, la fecha de nacimiento, así como también la fecha de clasificación y la adjudicación al grupo de tratamiento. La temperatura durante el estudio se mantuvo a aproximadamente 24°C y la humedad relativa se mantuvo a aproximadamente 40–70%. Los animales fueron alojados bajo un ciclo de luz constante (12 horas de luz/oscuridad). Se dispuso agua corriente normal *ad libitum* para los animales.

iv) Tratamiento

25 Se trataron cuarenta ratones transgénicos hAPP hembra con 0,1 mg/kg de peso cada dos semanas o 10 mg/kg de peso cada tres semanas de la sustancia de ensayo XG-102 (SEC ID NO: 11) a dos dosis diferentes (n=12/grupos) o se trataron con el vehículo (n=12) s.c. una vez cada tres semanas durante cuatro meses.

v) Laberinto de Agua Morris (MWM)

30 El trabajo en el Laberinto de Agua Morris (MWM) se llevó a cabo en una pileta circular negra de un diámetro de 100 cm. Se llenó con agua corriente a una temperatura de 22 \pm 1°C y la pileta se dividió virtualmente en cuatro sectores. Se colocó una plataforma transparente (de 8 cm de diámetro) aproximadamente a 0,5 cm por debajo de la superficie del agua. Durante toda la sesión de ensayo, excepto en el pre-ensayo, la plataforma estaba situada en el cuadrante sudoeste de la pileta. Un día antes de los cuatro días que dura la sesión de entrenamiento, los animales fueron sometidos al denominado "pre-ensayo" (pruebas de una duración de 60 segundos), para confirmar que las capacidades visuales de cada animal eran normales. Únicamente los animales que cumplieron con este trabajo fueron incluidos en el ensayo MWM. En el trabajo MWM cada ratón tenía que llevar a cabo tres pruebas durante cuatro días consecutivos. Cada prueba única duraba un máximo de un minuto. Durante este tiempo, el ratón tenía la oportunidad de encontrar un objetivo escondido, diáfano. Si el animal no podía encontrar un "camino" para salir del agua, el investigador guiaba o colocaba al ratón en la plataforma. Después de cada prueba se dejaba descansar a los ratones en la plataforma durante 10-15 segundos. Durante este tiempo, los ratones tenían la posibilidad de orientarse acerca de los alrededores. Las investigaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de luz tenue para evitar influencias negativas en el sistema de seguimiento (Kaminski; PCS, Biomedical Research Systems). En las paredes que rodeaban la pileta se fijaron posters con símbolos geométricos negros (por ejemplo un círculo y un cuadrado) para que los ratones pudieran usar los símbolos como señales para su orientación. Un grupo de natación por grupo consistía en 5 o 6 ratones, de manera que se tomaron medidas para asegurar un tiempo de interprueba de aproximadamente cinco a diez minutos. Para cuantificar la latencia de escape (el tiempo [segundos] que necesitaba el ratón para encontrar la plataforma escondida y por tanto para escapar del agua), el trayecto (la longitud de la trayectoria en [metros] hasta alcanzar el objetivo) y el cumplimiento en el cuadrante señalado, se usó un sistema de rastreo computarizado. La computadora se conectó con una cámara colocada por arriba del centro de la pileta. La cámara detectó la señal del diodo emisor de luz (LED), el cual estaba fijado con una pequeña horquilla en la cola del ratón. Una hora después de la última prueba en el día 4 el ratón tenía que cumplir con el denominado examen probatorio. En ese tiempo, la plataforma fue retirada de la pileta y durante el examen probatorio de 1 minuto el investigador contó la cantidad de cruces sobre la posición objetivo anterior. Adicionalmente, se calculó el cumplimiento en este cuadrante así como también en los tres otros cuadrantes. Con esta prueba, los ratones no podían obtener un indicio de ninguna naturaleza de la plataforma.

vi) Muestreo de Tejidos

Al finalizar el período de tratamiento y después de todos los ensayos de conductismo, todos los ratones restantes (n = 28) fueron sacrificados. Para ello, todos los ratones fueron sedados con anestesia convencional por inhalación (Isofluran, Baxter) tal como se describió en SOP MET030. Se obtuvo fluido cerebroespinal (CSF) mediante disección cerrada y exposición del *foramen magnum*. Al quedar expuesto se insertó una pipeta Pasteur a una profundidad de aproximadamente 0,3 – 1 mm dentro del *foramen magnum*. Se recogió CSF por succionamiento y acción capilar hasta que cesó completamente el flujo. Dos alícuotas de cada muestra se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -80°C hasta estar listas para análisis adicional con técnica ELISA. Después de cada muestreo de CSF, cada ratón fue colocado en inclinación dorsal, se les abrió el tórax y se insertó una aguja de calibre 26 unida a una jeringa de 1 cc en la cavidad ventricular cardíaca derecha. Se aplicó una ligera succión a la aguja y se recogió sangre dentro del EDTA, que se usó para obtener plasma. Para obtener el plasma, se centrifugaron muestras de sangre de cada uno de los ratones a 1.750 rpm (700 g) durante 10 minutos en una centrifugadora (GS - 6R Beckman) usando un rotor con cubos giratorios (GH - 3.8 Beckman). Se congeló el plasma y se almacenó a -20°C hasta análisis adicional. Después del muestreo de sangre, los ratones transgénicos fueron perfusionados vía intracardíaca con 0,9% de cloruro de sodio. Se retiraron rápidamente los cerebros y se cortó el cerebelo. Los hemisferios derechos de todos los ratones se fijaron por inmersión en paraformaldehído/PBS al 4% recién producido (pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación los cerebros fueron transferidos a una solución de PBS en sacarosa al 15% durante 24 para asegurar la crioprotección. Al día siguiente se congelaron los cerebros en isopentano y se almacenaron a -80°C, hasta que se usaron para investigaciones histológicas (SOP MET042). Se pesaron los hemisferios izquierdos y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para análisis bioquímico.

vii) Determinación de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂

En cuatro fracciones diferentes de homogeneizado de cerebro de cada ratón Tg así como también en muestras de CSF, se evaluaron los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ con técnicas ELISA. Los equipos de ensayo ELISA A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ altamente sensibles se adquirieron en *The Genetics Company*TM, Suiza (SOP MET058). Se preparó CSF tal como se describió anteriormente. Para los homogeneizados de cerebro, los hemisferios congelados fueron homogeneizados en solución salina de pH regulado con tampón TRIS (TBS) (5 ml) que contenía un coctel inhibidor de proteasa. 1,25 ml de este homogeneizado inicial de TBS de cerebro se almacenaron a -80°C y se estudiaron otros 1,25 ml. El homogeneizado de cerebro restante (2,5 ml) fue centrifugado y el sobrenadante resultante (= fracción TBS) fue dividido en alícuotas y se mantuvo a -20°C hasta la determinación ELISA. El granulado se suspendió en Triton X-100 (2,5 ml), se centrifugó y el sobrenadante (= Triton fracción X-100) se dividió en alícuotas y se mantuvo a -20°C. Estas etapas se repitieron con SDS (2,5 ml). El granulado de la fracción SDS se suspendió en ácido fórmico al 70% (0,5ml) antes de posterior centrifugación.

El sobrenadante obtenido se neutralizó con TRIS 1M (9,5 ml), se dividió en alícuotas y se mantuvo a -20°C (= fracción FA). Las muestras de las cuatro fracciones de homogeneizado de cerebro (TBS, Triton X-100, SDS, y FA) se usaron para la determinación de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ con técnicas ELISA. Los equipos de ensayo ELISA se adquirieron en *The Genetics Company*TM, Suiza (SOP MET062). Pudo asumirse que TBS y Triton X-100 solubilizan las estructuras monoméricas a oligoméricas. Los polímeros tales como protofibrilas y las fibrilas insolubles en agua pudieron disolverse en SDS y FA. En este sentido la investigación de las cuatro fracciones proveen también estados de polimerización A.

viii) Evaluación de la Morfología de Cerebro

Se manipuló tejido cerebral de todos los animales Tg investigados exactamente de la misma manera para evitar derivaciones debidas a variaciones de este procedimiento. De las mitades de cerebro de 24 ratones Tg (8 de cada grupo) 20 crio-secciones por capa (en total 5 capas), cada una de un espesor de 10 μ m (Leica CM 3050S) fueron cortadas sagitalmente y 5 (una de cada capa) fueron procesadas y evaluadas para cuantificar la carga de las placas. Las cinco capas sagitales se correspondían con las Fig. 104 a 105, 107 a 108, 111 a 112, 115 a 116 y 118 a 119 de acuerdo con la morfología atlas "The Mouse Brain" de Paxinos y Franklin (2ª edición). La primera capa fue especificada por el requerimiento de incluir el hipocampo completo con sus regiones CA1, CA2, CA3, GD1b y GDmb. La inmunorreactividad se evaluó cuantitativamente en el hipocampo y en la corteza usando el anticuerpo específico A β -monoclonal humano 6E10 (Signet) así como también tinción con Tioflavina S. Los hemisferios cerebrales remanentes o los tejidos no usados se guardaron y almacenaron en JSW CNS hasta el final del proyecto.

b) EVALUACION

i) Conductismo

En las pruebas del Laberinto de Agua Morris la longitud del trayecto de natación, las latencias de escape, la velocidad de natación y, en el examen probatorio, los cruces sobre la posición de la plataforma anterior y el tiempo que transcurre en cada cuadrante de la pileta se midieron para cada animal Tg con un software de computadora especial.

ii) Evaluación Bioquímica

De todos los ratones Tg, se analizaron las muestras de CSF, así como también las preparaciones de cerebro con A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ de ELISA comerciales. Se llevaron a cabo mediciones de modelos adecuados. Se analizaron muestras de preparaciones de cerebro por duplicado. Debido a la pequeña cantidad de muestras, las muestras de CSF fueron analizadas en una única medición.

iii) Histología

i1) Medición de Deposiciones Amiloides y Carga de Placas

Para la inmunohistoquímica de 6E10 se usó el procedimiento de evaluación siguiente:

- aa) Contrastado de la imagen para visualizar los bordes sin aplicar contraste a la imagen.
- 10 bb) Trazado interactivo de los contornos corticales y la medida del área cortical (= área de región).
- cc) Trazado interactivo del área de interés (AOI), en la cual se detectaron objetos teñidos superiores a un nivel umbral basado en cierta intensidad (igual para cada imagen) y de tamaño superior a 8 μm^2 .
- dd) Medición del área de cada objeto, la suma de área teñida en el AOI así como también la cantidad de objetos después de contrastado suave para mejorar la relación señal/ruido (lo mismo para cada imagen).
- 15 ee) Repetición de aa)-dd) para el hipocampo.
- ff) Cálculo del tamaño promedio de placa (= "área total de placas/ cantidad de placas"), la cantidad diaria de placas relativa (= "cantidad de placas/ área de la región" y "área total de placas/ área de la región * 100").
- gg) Datos automáticos exportados a una hoja Excel extendida que incluye los parámetros "título de imagen, área de la región, cantidad de placas, suma del área de placas, cantidad de placas relativa, área de placa relativas y tamaño promedio de placas". Se usó un campo para notas de registro de calidad de imagen y criterios de exclusión, respectivamente. Los criterios de exclusión fueron partes no presentes de los bordes, arrugas, imperfecciones dominantes o inconsistencias de tinción (por ejemplo debido a pandeo, que puede impedir la reacción completa del reactivo bloqueador)
- 20 hh) Cierre de imagen sin salvar (para mantener los datos en bruto).

25 c) RESULTADOS

i) Observaciones Generales

En total 40 ratones hAPP Tg hembra fueron incluidos en el estudio. De estos ratones, 12 animales murieron debido a razones desconocidas antes de terminar el período de tratamiento.

ii) Resultados de Conductismo

30 El aprendizaje espacial en el MWM se mantuvo sin verse influenciado por el tratamiento XG-102 (SEC ID NO: 11). Los ratones tratados con 0,1 mg/kg mostraron tendencia a empeorar en el rendimiento de aprendizaje en el día 1 y el día 4. Un ANOVA de dos vías del rendimiento promedio en el día 1 y 4 reveló un aprendizaje sumamente significativo para todos los grupos ($p < 0,001$), pero también una influencia significativa del factor de tratamiento ($p = 0,045$). Sin embargo, los post-ensayos de Bonferroni no tuvieron significancia.

35 iii) Resultados Bioquímicos

aa) Niveles A β en las Fracciones de Homogeneizado de Cerebro

40 El tratamiento con el compuesto de ensayo XG-102 (SEC ID NO: 11) no afectó los niveles A β ₁₋₄₀ de homogeneizado de cerebro (ver Fig. 11). Las diferencias de grupo en los niveles A β ₁₋₄₂ aparecieron únicamente en las fracciones Triton X-100. Allí, los animales tratados con la dosis baja del compuesto de ensayo XG-102 (SEC ID NO: 11) (0,1 mg/kg) mostraron una reducción significativa en comparación con el grupo vehículo ($p < 0,05$) así como también en comparación con el grupo de dosis alta ($p < 0,01$).

bb) Niveles de A β en CSF

Después del tratamiento con la sustancia de ensayo XG-102 (SEC ID NO: 2), los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ disminuyeron significativamente en CSF en comparación con el grupo vehículo. Para ambos, los valores p A β ₁₋₄₀ y

A β ₁₋₄₂ fueron $p < 0,01$ para la dosis alta (10 mg/kg) y $p < 0,05$ para la dosis de pérdida de XG-102 (SEC ID NO: 2) (ver Fig. 12).

iv) Resultados de Histología de Cerebro e Inmunohistoquímica

aa) Deposición de Amiloides y Carga de Placas

5 La carga de la placa se cuantificó con dos métodos diferentes. Por una parte se efectuó una tinción de un IHC con 6E10 primario dirigido contra AA1-17 del péptido amiloide humano, por otra parte se llevó a cabo una tinción con Tioflavina S marcando estructuras de láminas-beta y núcleos de placas neuríticas maduras. Ante todo, las áreas de
10 región medidas, la corteza y el hipocampo fueron altamente constantes en todos los grupos, lo cual indica que pueden excluirse problemas en los procedimientos de corte de IHC y hasta cierto grado también una atrofia inducida por tratamiento (cambios de $>5\%$ serían detectables con este método). Las cuantificaciones de 6E10 y TioflavinaS
15 revelaron una reducción selectiva de estructuras de láminas beta en el centro de las placas después del tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11), mientras que el amiloide humano no se vió influenciado por el tratamiento o aumentó ligeramente. En detalle, la carga de placa cortical 6E10 IR se incrementó frente al vehículo en los ratones tratados con 10 mg/kg de XG-102 (SEC ID NO: 11), pero se alcanzó un nivel de significancia para la cantidad de placas del
20 hipocampo. Por el contrario, las Fig. 13 y 14 muestran con 6E10 IHC que el tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) condujo a una reducción dependiente negativamente de la dosis, de la cantidad de placas positivas de TioflavinaS de hipocampo, así como también el tratamiento de porcentaje de área (cantidad de placas $p < 0,05$ para 10mg/kg, $p < 0,01$ para 0,1 mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11)). 0,1mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11) redujo también el tamaño medio de las placas, pero este efecto no alcanzó un nivel de significancia en ANOVA (ensayo T de dos
25 colas, no apareado: $p = 0,074$). Estos efectos no se vieron para placas corticales, una circunstancia que muy probablemente se debe al posterior desencadenamiento de la patología de placas en el hipocampo más que en la corteza. El inicio del tratamiento a los 5 meses de edad acierta exactamente con el momento de la deposición de placas en el hipocampo, mientras que las placas corticales comienzan a ser visibles al aumento empleado para la cuantificación a la edad de 3 meses. Cualitativamente, la proporción de 6E10 a placas teñidas con TioflavinaS
30 aumenta y los núcleos de las placas de láminas beta, tal como se observan en los bordes marcados doblemente, se tornan de tamaño más pequeño. Resumiendo, estos datos apoyan el hecho de que el tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) actúa contra la formación de láminas beta en la fase precoz de deposición de placas y en la formación de láminas beta en núcleos de placas, respectivamente.

d) SUMARIO DE EFECTOS Y CONCLUSIONES

30 • La navegación espacial medida en el laberinto de agua de Morris no se vió influenciada por el tratamiento. El tratamiento con 0,1 mg/kg de XG-102 (SEC ID NO 11) dio como resultado un rendimiento de aprendizaje ligeramente más pobre entre el primer y el último día de entrenamiento.
• Excepto una disminución en la fracción de Triton X-100 en el grupo 0,1 mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11), los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ en el cerebro permanecieron estables.
35 • Una disminución de los niveles A β fue detectable en CSF para ambas dosis y fragmentos.
• El tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11) condujo a una tendencia incremental de beta amiloide humano en el grupo de dosis más alta en las cuantificaciones 6E10, lo cual está de acuerdo con los datos obtenidos en A β ELISA.
40 • En contraste a la carga de lámina beta de hipocampo detectada con tinción con Tioflavina S que disminuía de forma dosis-dependiente después del tratamiento con XG-102 (SEC ID NO: 11), a un grado superior a la dosis más baja de 0,1 mg/kg XG-102 (SEC ID NO: 11), la carga de placa cortical permaneció sin cambios. De acuerdo con el inicio dependiente de la edad de la deposición de placas en el hipocampo al comienzo del tratamiento, esto sugiere una acción precoz sobre la formación de láminas beta en la fase precoz de deposición de placas.

45 **Ejemplo 15: Determinación de la actividad de los péptidos IB(s) retroinversos todo D y sus variantes en el tratamiento de la diabetes tipo 2**

El Ejemplo 15 está diseñado para determinar la actividad de los péptidos IB(s) y retroinversos todo D y sus variantes en el tratamiento de la diabetes de Tipo 2, particularmente para determinar el efecto del tratamiento crónico con XG-102 (SEC ID NO: 11) en un modelo de ratones db/db de diabetes de tipo 2 mediante la evaluación de los niveles de
50 glucosa en sangre en ayunas cada tercer día (28 días).

a) Materiales y métodos

i) Animales

Se obtuvieron un total de veinte (20) ratones Charles River macho db/db (de 8 semanas de vida) (0Alemania). Al llegar, los animales se alojaron en grupos ($n = 6-7$ /grupo) y se les ofreció comida común para roedores (Altromin standard #1324 chow; C. Petersen, Ringsted, Dinamarca) y agua *ad libitum* a menos que se indicara lo contrario.
55

Los ratones fueron alojados bajo un ciclo de 12:12 L/D (luz a las 4:00 y luces apagadas a las 16:00) y en ambientes de temperatura y humedad controlados.

ii) Grupos y aleatoriedad

5 En el día 4, los ratones fueron distribuidos de acuerdo con el nivel de glucosa en sangre (en ayunas, glucosa en sangre medida en un analizador en línea Biosen S (EKF diagnostic, Alemania) para participar en uno de los siguiente grupos de tratamiento con fármaco (n=6):

- 1) Vehículo de control, S.C. (solución fisiológica salina)
- 2) XG-102 (SEC ID NO: 11); 1 mg/kg; s.c.
- 3) XG-102 (SEC ID NO: 11); 10 mg/kg; s.c

10 Todas las dosis citadas se calcularon para la base libre. Pureza de la droga: 95,28%, contenido de péptido: 78,0%. Todos los compuestos se administraron subcutáneamente (s.c.) a un volumen de 3 ml/kg. Las instrucciones para la formulación del vehículo control y XG-102 (SEC ID NO: 11) fueron:

15 Primero, se disolvió XG-102 (SEC ID NO: 11) en el vehículo. Las formulaciones (concentraciones de 0,33 y 3,3 mg/ml, que corresponden a las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente) se prepararon de acuerdo con el procedimiento que se detalla a continuación. Las concentraciones se calcularon y expresaron teniendo en cuenta los items de ensayo, la pureza y el contenido de péptidos (el coeficiente multiplicador era 1,346).

- 20
 - Preparación de una solución de carga: el compuesto XG-102 secado por congelación (SEC ID NO: 11) se descongeló durante al menos una hora y se preparó de acuerdo con una solución de carga en el vehículo a 1 mM (que correspondía a 3,823 mg/ml). Se prepararon alícuotas para cada día de tratamiento y se almacenaron aproximadamente a -80°C. Las diluciones de esta solución de carga a las concentraciones requeridas se llevaron a cabo cada día del tratamiento.
 - Almacenamiento de la solución de carga: aproximadamente a -80°C.
 - Almacenamiento de las preparaciones diluidas: a temperatura ambiente durante 24 horas como máximo.

25 Antes de la solubilización, el polvo se almacenó a -20°C. La estabilidad de la solución de carga es de 3 meses a aproximadamente -80°C; la estabilidad de las formulaciones diluidas para la dosis a animales es de 24 horas a temperatura ambiente. El material diluido no usado podría almacenarse hasta 7 días con la condición de mantenerlo a 4-8°C.

c) Procedimiento Experimental

30 Después de 8 días de aclimatación, los ratones fueron tratados diariamente a las 08:00 AM durante 21 días con una dosis SC 8 horas antes de apagar la luz a las 04:00 PM de acuerdo con los grupos señalados. En el estudio del día 21, la dosis de la concentración más elevada de XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) se interrumpió mientras que la dosis diaria del vehículo de control y XG-102 (SEC ID NO: 2) (1 mg/kg) se continuó hasta el día de estudio 28. Desde el día 28 hasta terminar en el día 111 los ratones tratados con vehículo y XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) fueron observados en un período sin acción (sin dosificación) mientras que el tratamiento de los ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 2) (1 mg/kg) terminó después de 28 días de tratamiento.

i) Glucosa en sangre

Se midió la glucosa en sangre en animales con un ayuno de 7 horas, 6 horas post-dosificación, por recolección de 10 µl de muestras de sangre de la vena de la cola en tubos hematocritos y subsiguiente análisis en un analizador Biosen s-line (EKF-diagnostic; Alemania).

40 ii) Jaulas Metabólicas

Grupos de 1+3: Se colocaron ratones macho en jaulas metabólicas para registrar la ingestión de comida y agua durante las 24 horas, así como también la producción de orina y heces durante 24 horas. Los ratones fueron estratificados en dos subgrupos de n = 6-7 y se llevó a cabo la caracterización metabólica en los días de estudio 71-72.

45 iii) Panel de Adipocina

Grupos 1+3: En tres ocasiones (estudio de los días 57, 66 y 108) se recogió sangre de la vena de la cola usando tubos de hematocrito recubiertos con EDTA (100 µl). Después de centrifugar la sangre, el plasma se recogió y almacenó a -20°C hasta el momento de la medición. Se determinó el panel siguiente de adipocinas/citoquinas usando 7-plex basado en Luminex: leptina, resistina, MCP-1, PAI-1, TNF, insulina e interleucina-6 (IL-6).

iv) Terminación

5 Grupos 1+3 (día 111): Los siguientes órganos fueron extirpados y pesados: grasa subcutánea inguinal, grasa epididimal, grasa retroperitoneal, cerebro, hígado, riñón, bazo y corazón. Se guardaron muestras de los órganos indicados en 4% de PFA para posibles futuros exámenes histopatológicos. Asimismo se tomaron muestras del páncreas (en bloque) para posibles análisis estereológicos e inmunohistoquímicos y muestras de los ojos para un posible análisis posterior de retinopatía. Grupo 2 (día 28): No se recogieron ni tejidos ni plasma.

c) Resultados

i) Observaciones Generales

10 Durante el período de dosis aguda los animales mostraron niveles de alerta y actividad y no hubo signos de sedación en los animales tratados con medicamentos. La ingestión de agua y comida estaba dentro de los rangos normales entre los animales tratados con vehículo. Sin embargo después de aproximadamente 2 semanas de dosis, se observó fibrosis nodular en el tejido subcutáneo como reacción al compuesto XG-102 (SEC ID NO: 2) en dosis altas, y estas progresaron en heridas abiertas en todos los ratones del Grupo C. En el grupo B se observó fibrosis nodular leve. En consecuencia, se usaron sitios alternados para la inyección. Después de finalizar la administración de dosis a los animales, se curaron y la fibrosis nodular desapareció gradualmente. No se observaron efectos clínicos en los animales tratados con vehículo.

ii) Glucosa en la sangre

20 Los niveles de glucosa en sangre, en ayunas (absoluta y relativa) se muestran en la Fig. 15. La glucosa en sangre en ayunas se midió cada tercer día hasta el día 68 y regularmente hasta terminar el día 111 en los Grupos A y C. Se observó una disminución clara y significativa ($p < 0,001$) en el nivel de glucosa en ayunas en la sangre de los ratones diabéticos db/db tratados con XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en comparación con el vehículo control. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas de los ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) alcanzaron una meseta baja de aproximadamente 5 mmol/l. Este efecto fue evidente después de 14 días de dosificación y persistió durante el estudio, por tanto durante todo el período de descanso desde el día 21 hasta el día 111. En contraste, no observamos ningún efecto de dosis bajas de XG-102 (SEC ID NO: 2) (1 mg/kg) durante los 28 días de administración de dosis.

iii) Peso Corporal

30 Las determinaciones del peso corporal (absoluta y relativa) se muestran en la Fig. 16. Se observó una prevención clara y significativa ($p < 0,001$) del aumento de peso corporal en ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en comparación con el vehículo control. Este efecto fue evidente desde día 28 de dosificación y permaneció hasta el día de finalización 111. En contraste, no se observó ningún efecto de dosis bajas de XG-102 (SEC ID NO: 2) (1 mg/kg) en el peso corporal durante 28 días de administración de dosis.

iv) Jaulas Metabólicas

35 El efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en las 24 horas de ingestión de comida y agua, la producción de orina y heces medidas en jaulas metabólicas en el estudio del día 68 se muestran en la Fig. 17 (g) y 18 (normalizada a g de peso corporal). No se observaron efectos significativos de XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en ninguno de los parámetros medidos, en comparación con la observación control del vehículo, sino una tendencia a una disminución en la ingesta de alimento y en la producción de orina.

v) Adipoquinas

40 El efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) medido en el día 57, 77 y 108 sobre los niveles de insulina en plasma, MCP-1 y IL-6 se muestran en la Fig. 19; los niveles de plasma de tPAI-1, TNF y resistina en la Fig. 20. No se observaron efectos significativos de XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en ninguno de los parámetros medidos en comparación con el vehículo control, excepto en los niveles de resistina en plasma, que fueron significativamente más elevados en los animales tratados con XG-102 (SEC ID NO: 2) en el día 77 y 108.

45 vi) Peso del tejido en la finalización

50 El efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) sobre el peso del tejido epididimal, inguinal, subcutáneo y acumulaciones grasas retroperitoneales se muestra en la Fig. 21. Se observó una disminución significativa de la masa grasa epididimal ($p < 0,05$) y retroperitoneal ($p < 0,01$) en los ratones tratados con XG-102 en comparación con el vehículo control. El efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en el peso del tejido de cerebro, bazo y corazón se muestra en la Fig. 22. No se observaron efectos significativos de XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) en estos parámetros en comparación con el vehículo control. Finalmente, el efecto del vehículo o XG-102 (SEC ID NO: 2) (10 mg/kg) sobre el peso de los tejidos de riñón e hígado se muestran en la Fig. 23. Se observó una

disminución significativa de masa renal ($p < 0,05$) y hepática ($p < 0,01$) en los ratones tratados con XG-102 (SEC ID NO: 2) en comparación con el vehículo control.

5 Resumiendo los resultados, la administración de XG-102 (SEC ID NO: 11), 10 mg/kg, parece conducir a una disminución significativa de los niveles de glucosa en sangre y, por tanto, XG-102 (SEC ID NO: 11) parece ser una nueva herramienta prometedora para el tratamiento de la diabetes y de niveles elevados de glucosa en sangre.

REIVINDICACIONES

1. Péptido inhibidor de JNK consistente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 o péptido quimérico consistente en un primer dominio y un segundo dominio unidos mediante un enlace covalente, comprendiendo el primer dominio una secuencia de tráfico y consistiendo el segundo dominio en una secuencia inhibidora de JNK de acuerdo con la SEC ID NO: 2, para su uso en un método de tratamiento de enfermedades cancerosas seleccionadas de entre sarcoma de Kaposi, leucemia mieloide aguda, incluyendo eritroleucemia, melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas renales, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, carcinomas mamarios (= cáncer de mama), cáncer de útero, cáncer cervical, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, como papiloma, carcinomas inducidos por virus (por ejemplo carcinoma de cérvix = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por el virus del herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma EBV inducido por células B), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma acústico, carcinomas pulmonares (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma rectal, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebral, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer testicular, carcinoma de tiroides, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumores de la pituitaria, micosis fungoides, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma corpus, cáncer de huesos, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulval, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinoma de ovario, tumores de tejidos blandos, cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma pancreático (= cáncer pancreático), carcinoma del endometrio, metástasis hepáticas, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de la vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumores del páncreo, cáncer de próstata (= tumores prostáticos).
2. Péptido quimérico para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el primer dominio está unido al extremo C-terminal del segundo dominio.
3. Péptido quimérico para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque el primer dominio y el segundo dominio están unidos directamente el uno al otro o están unidos el uno al otro mediante una secuencia enlazante que comprende de 1 a 10 aminoácidos.
4. Péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la secuencia de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT del virus de la inmunodeficiencia humana.
5. Péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la secuencia de tráfico consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5, 6, 7, 8, 21 o 22.
6. Péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la secuencia de tráfico aumenta la absorción celular del péptido y/o dirige la localización nuclear del péptido.
7. Péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el péptido quimérico consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11.
8. Péptido inhibidor de JNK para su uso según la reivindicación 1 o péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el péptido inhibidor de JNK o el péptido quimérico se administra mediante una vía de administración seleccionada de entre el grupo consistente en vías parenterales, incluyendo intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, transdérmica, vías enterales, incluyendo oral, rectal, vías tópicas, incluyendo nasal, intranasal, y otras vías, incluyendo epidérmica y liberación desde parches.
9. Péptido inhibidor de JNK para su uso según la reivindicación 1 u8, o péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque una dosis (por kg de peso corporal) del péptido inhibidor de JNK o del péptido quimérico oscila en el intervalo de hasta 10 mmol/kg, preferentemente de hasta 1 mmol/kg, de forma especialmente preferente de hasta 100 μ mol/kg, de forma todavía más preferente de hasta 10 μ mol/kg, de forma todavía más preferente de hasta 1 μ mol/kg, de forma todavía más preferente de hasta 100 nmol/kg, y de forma totalmente preferente de hasta 50 nmol/kg.
10. Péptido inhibidor de JNK para su uso según la reivindicación 1, 8 o 9, o péptido quimérico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque una dosis del péptido inhibidor de JNK o del péptido quimérico está en el intervalo de aproximadamente 1 pmol/kg a aproximadamente 1 mmol/kg,

- 5 entre aproximadamente 10 pmol/kg a aproximadamente 0,1 mmol/kg, entre aproximadamente 10 pmol/kg a aproximadamente 0,01 mmol/kg, entre aproximadamente 50 pmol/kg a aproximadamente 1 μ mol/kg, entre aproximadamente 100 pmol/kg a aproximadamente 500 nmol/kg, entre aproximadamente 200 pmol/kg a aproximadamente 300 nmol/kg, entre aproximadamente 300 pmol/kg a aproximadamente 100 nmol/kg, entre aproximadamente 500 pmol/kg a aproximadamente 50 nmol/kg, entre aproximadamente 750 pmol/kg a aproximadamente 30 nmol/kg, entre aproximadamente 250 pmol/kg a aproximadamente 5 nmol/kg, entre aproximadamente 1 nmol/kg a aproximadamente 10 nmol/kg, o una combinación de dos cualesquiera de estos valores.

Secuencias de péptidos, humano, ratón y rata

```

A
IB2      :      IPSPSVEEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
IB1      :      PGTGCGD TYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT
c-Jun    :      GAYGYNPKILKQSMTLNLD PVGNLKP
ATF2     :      TNEDHLAVHKHKHEM TLKFGPARNDSVIV
          ::  **.:

B
L-IB1(s) :      : . . ***** * **.;
L-IB1    :      ---RPKRPTTLNLFQVPRSQD
          :      DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT
          :      ° ° °

C
L-TAT    :      NH2-GRKKRRQRRR-COOH
L-TAT-IB1(s) :      NH2-GRKKRRQRRRPP---RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH
L-TAT-IB1 :      NH2-GRKKRRQRRRPPD TYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH

D-TAT    :      NH2-RRRQRRKRG-COOH
D-TAT-IB1(s) :      NH2--DQSRPVQPF LNLTTPRKPR---PPRRRQRRKRG-COOH
D-TAT-IB1 :      NH2-TDQSRPVQPF LNLTTPRKPRYTD PRRRQRRKRG-COOH

```

Fig. 1

Secuencias genéricas, humano, ratón y rata

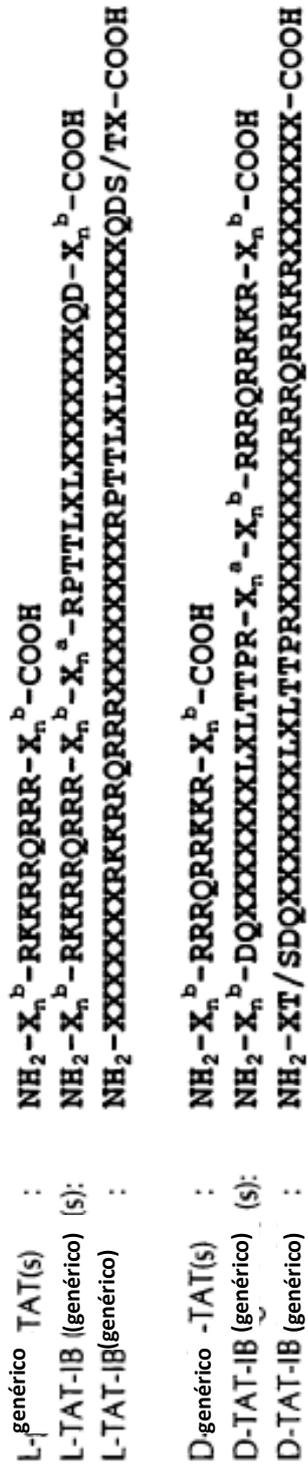


Fig. 2

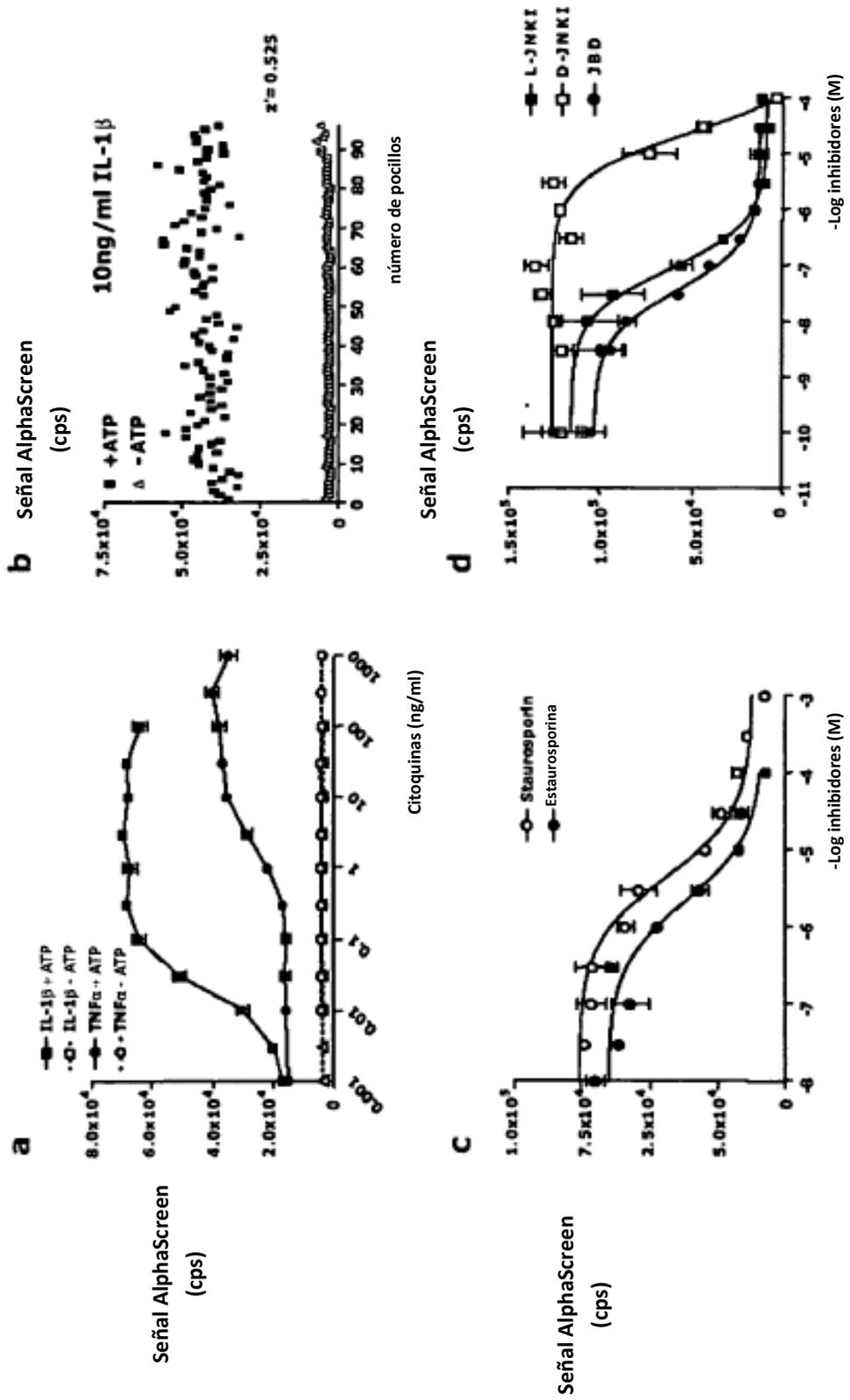


Fig. 3

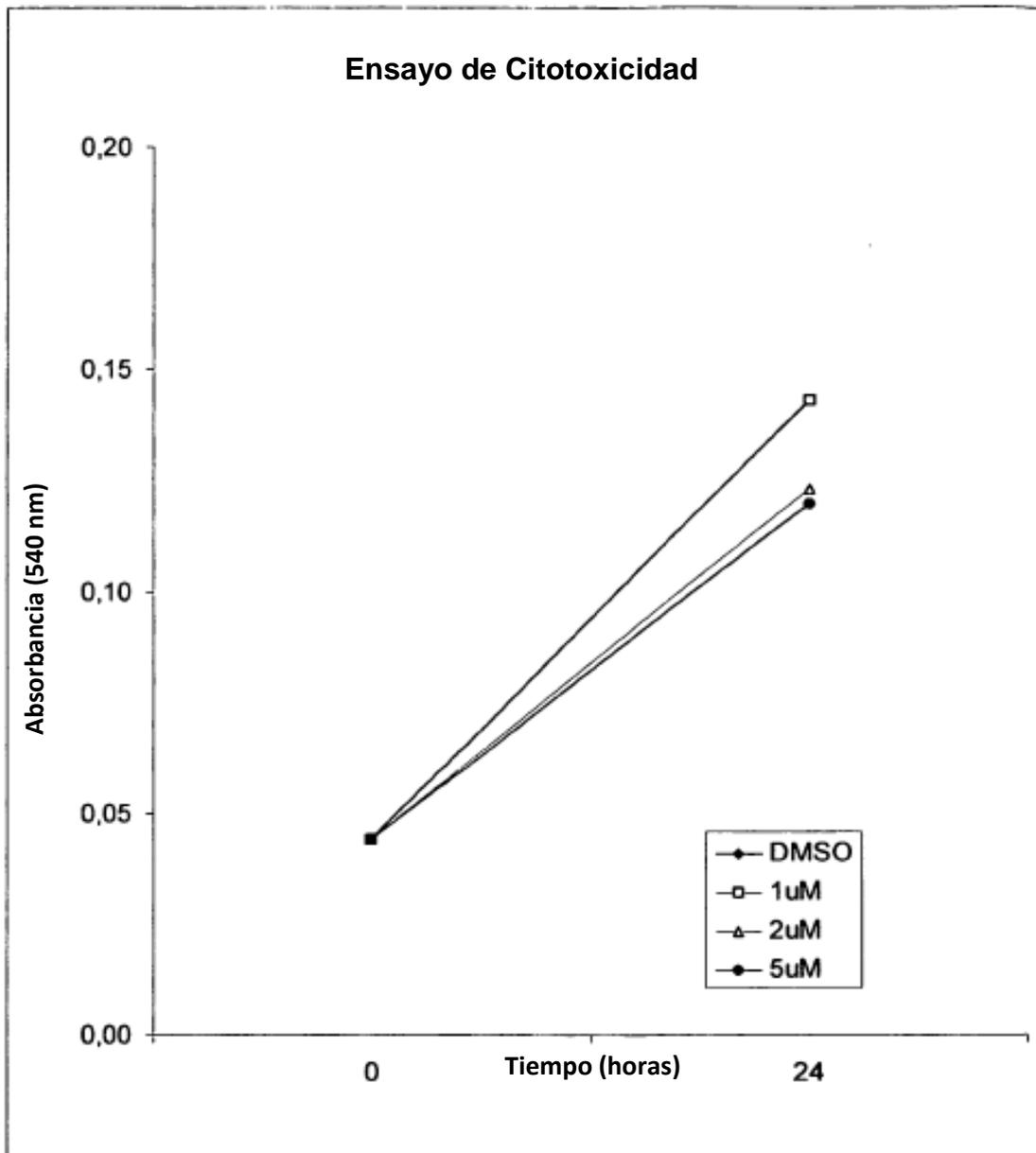


Fig. 4

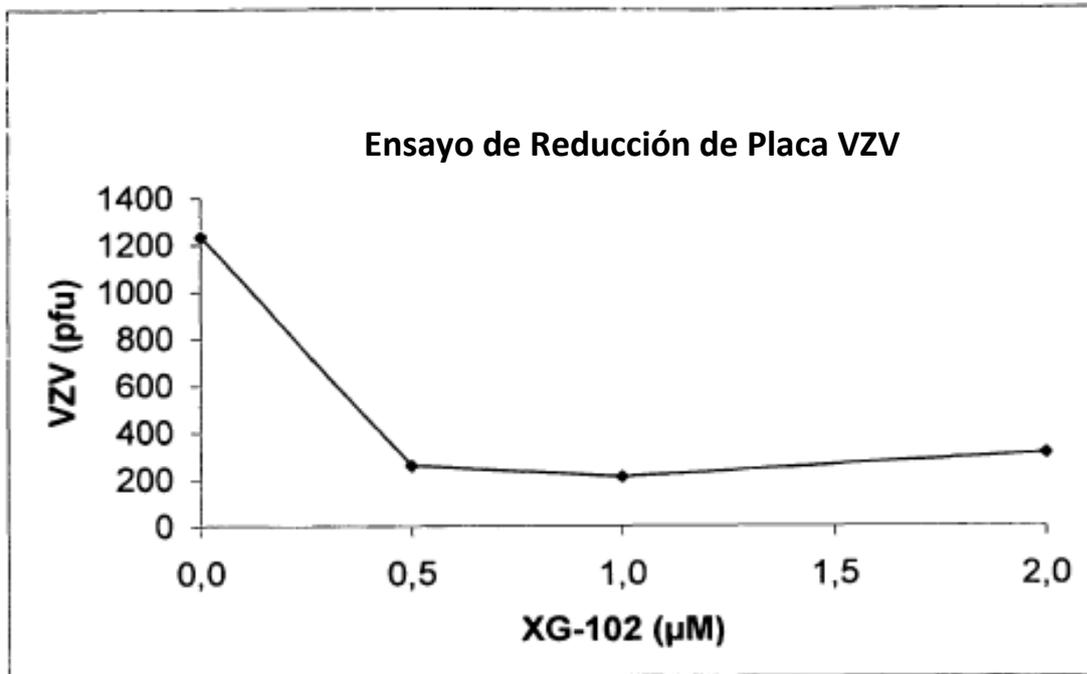


Fig. 5

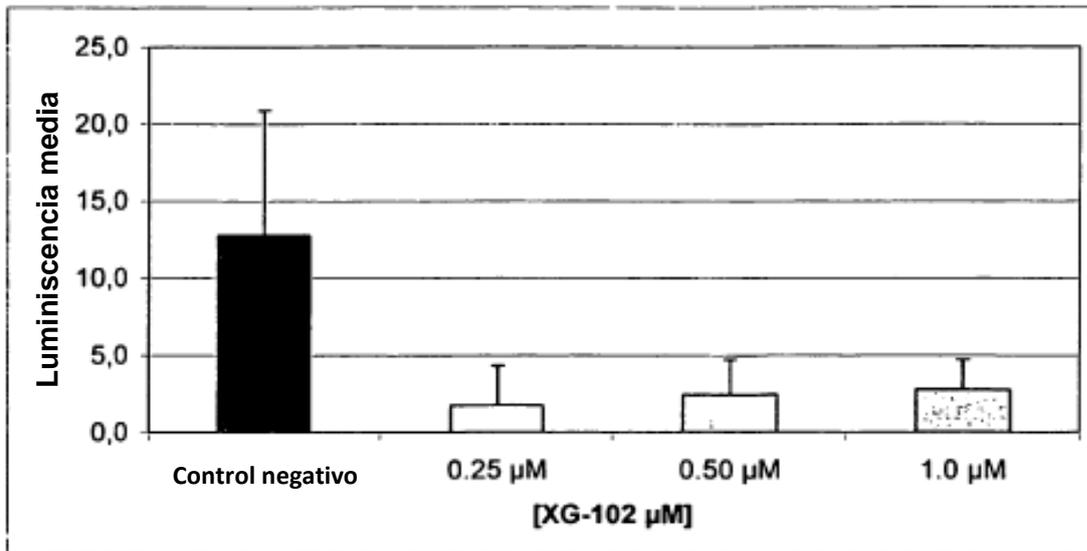


Fig. 6

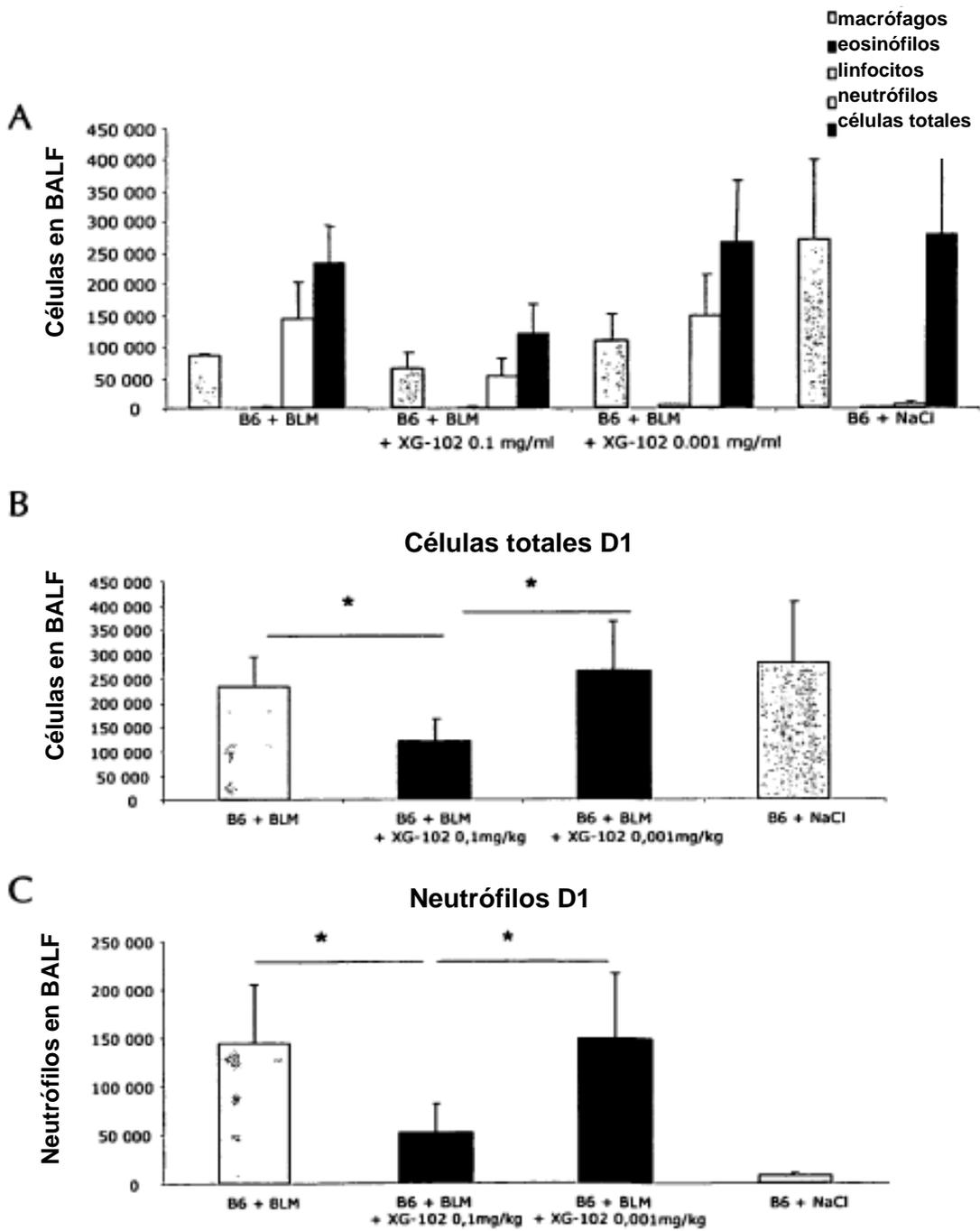


Fig. 7

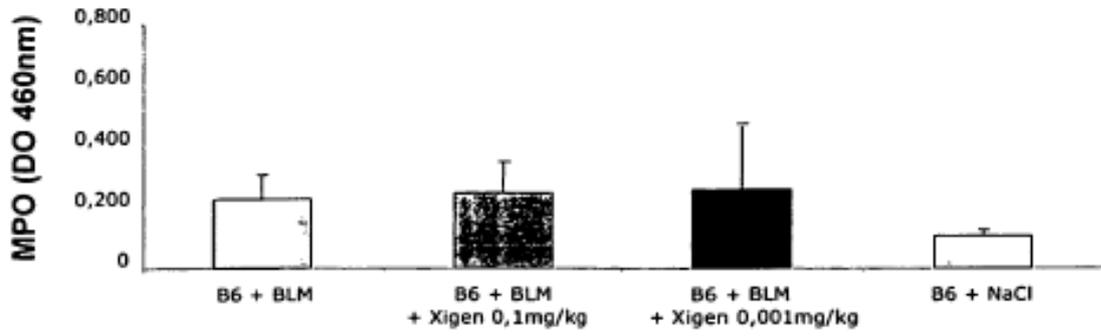


Fig. 8

TNF en BALF por grupos después de BLM en D1

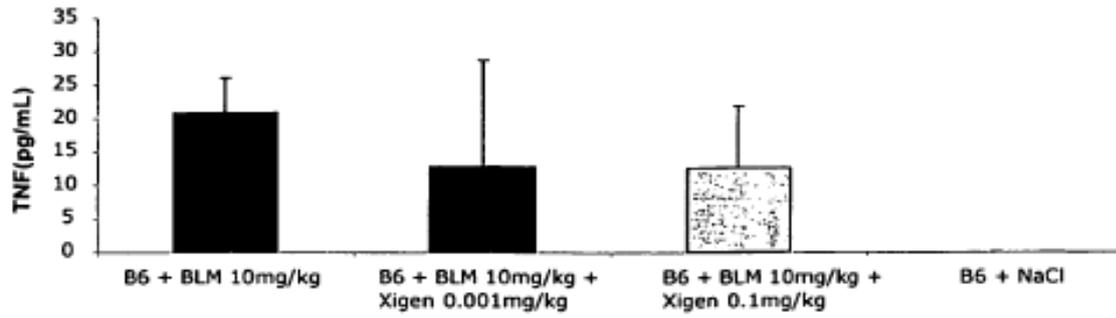


Fig. 9

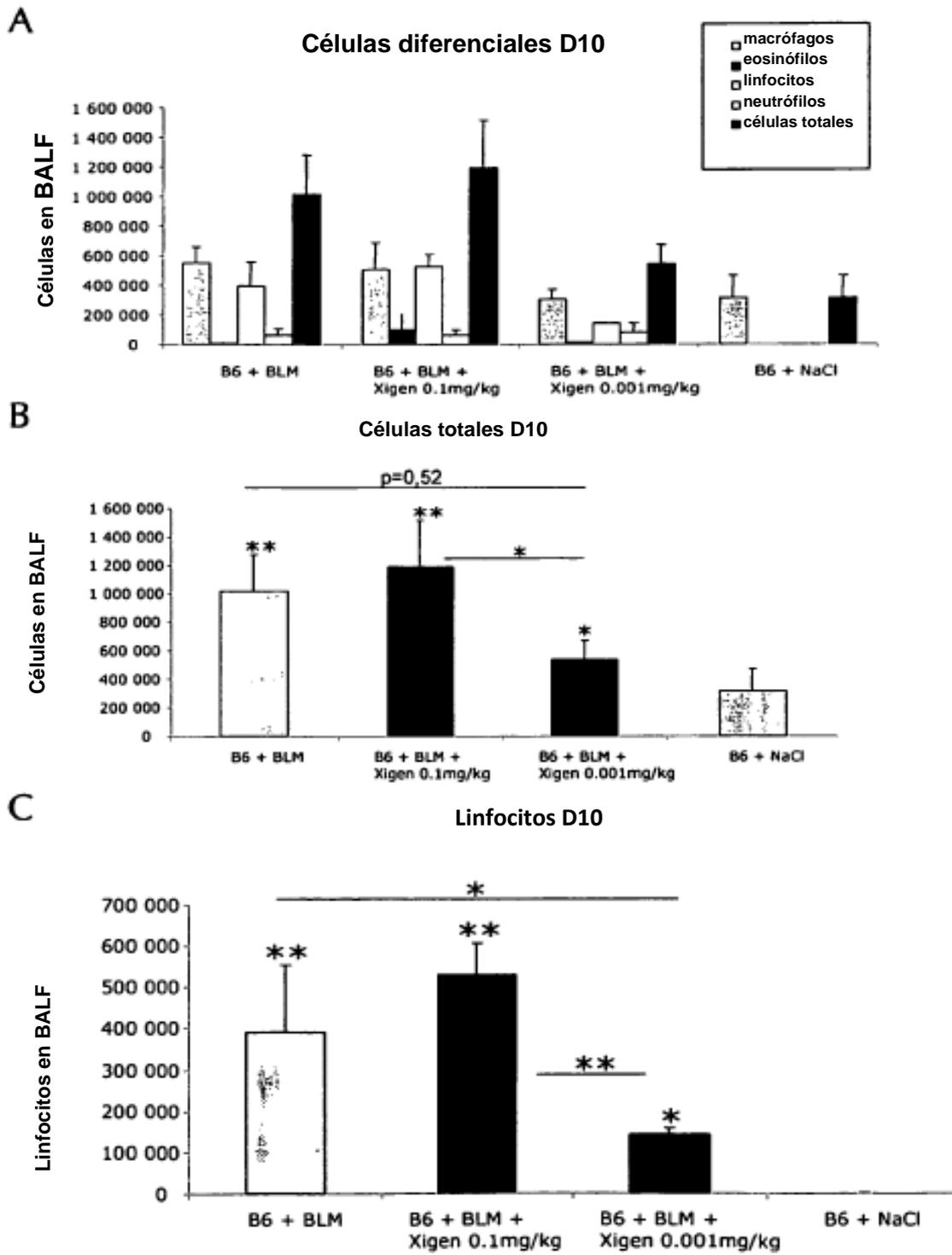


Fig. 10

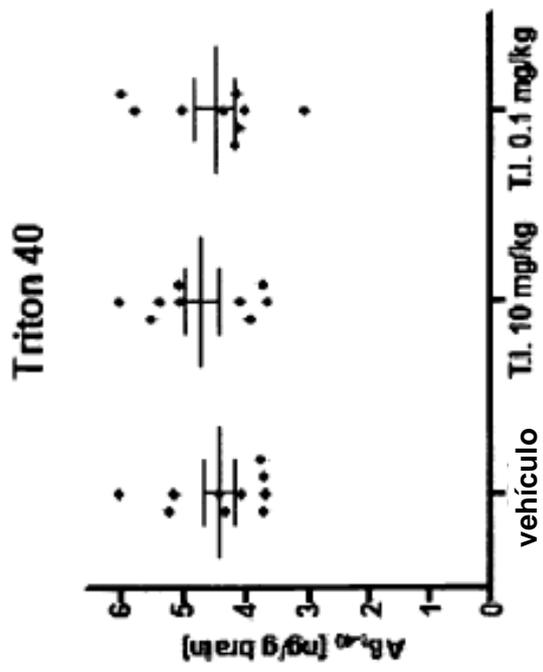
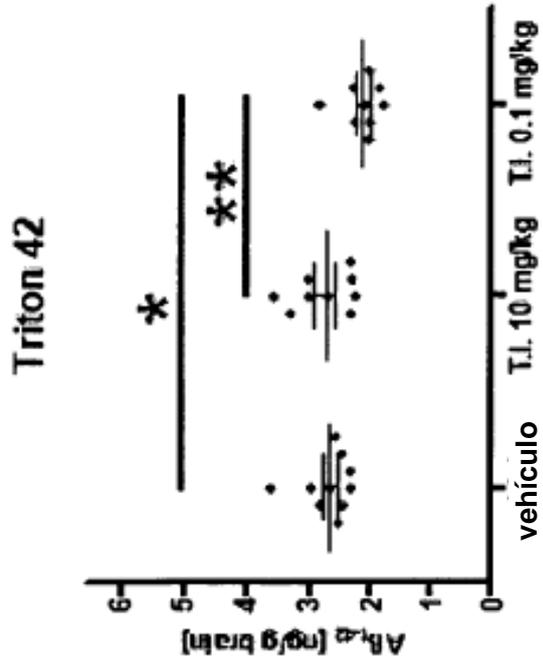


Fig. 11

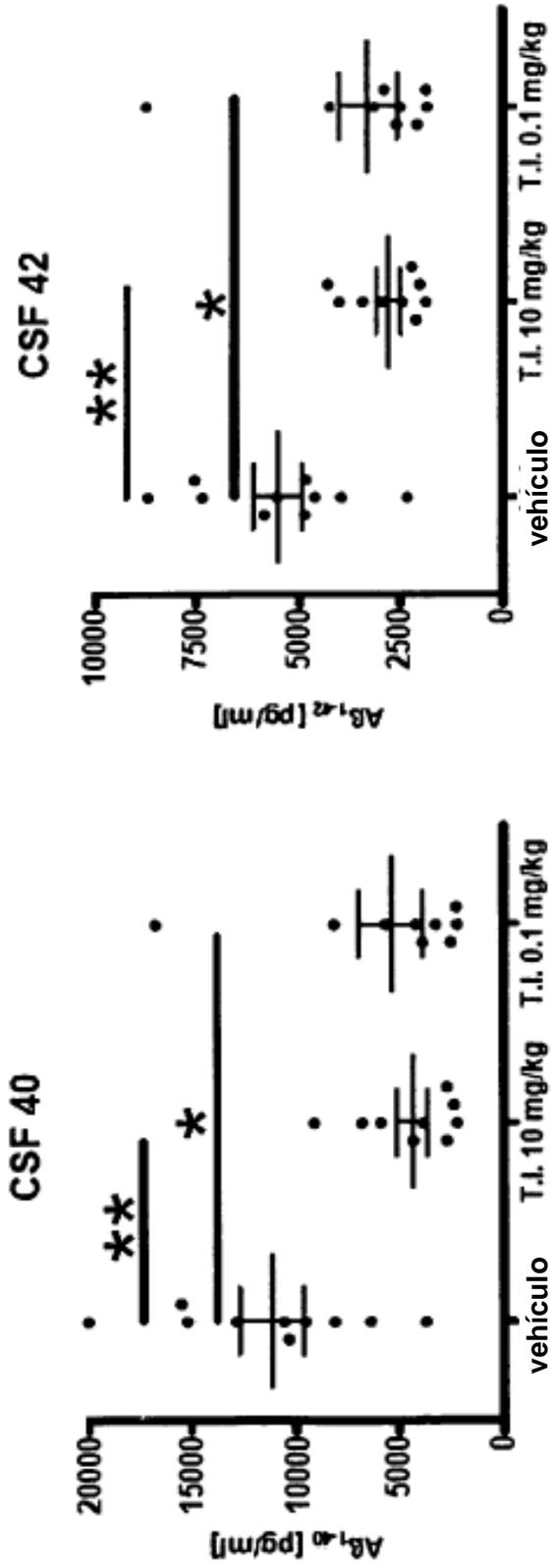


Fig. 12

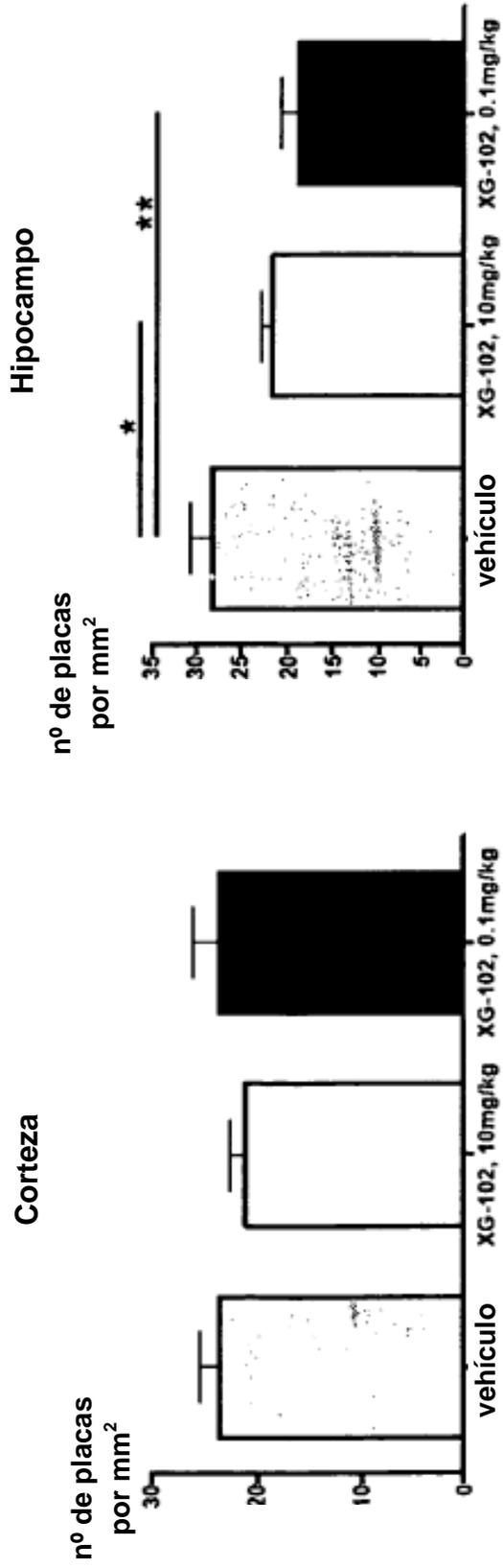


Fig. 13

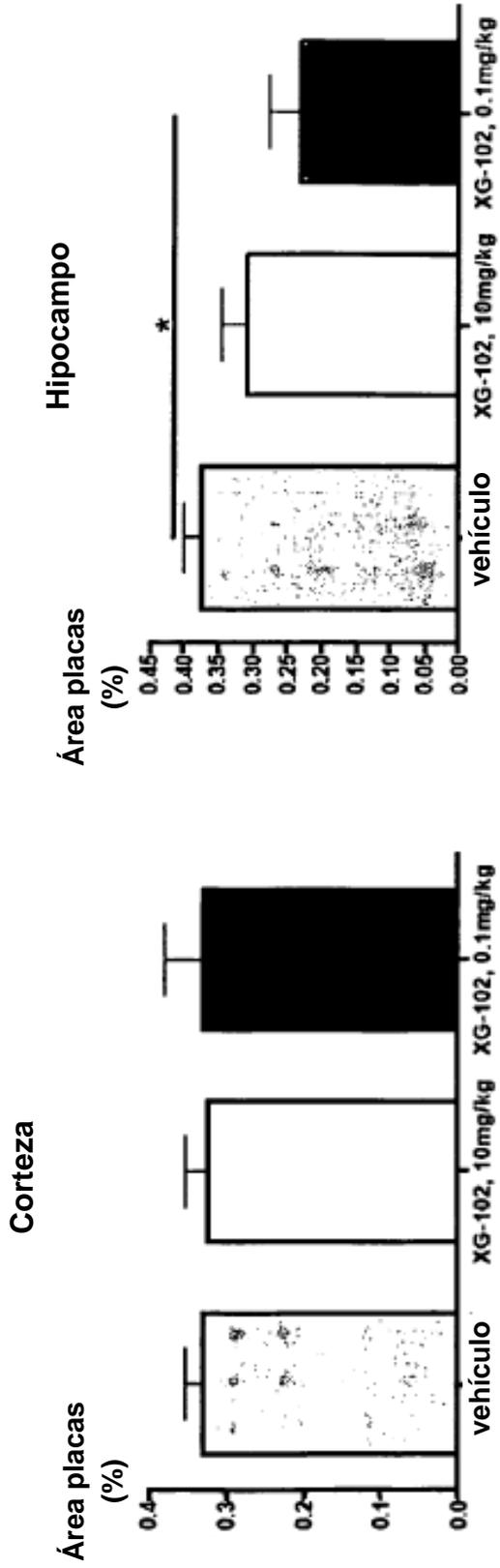


Fig. 14

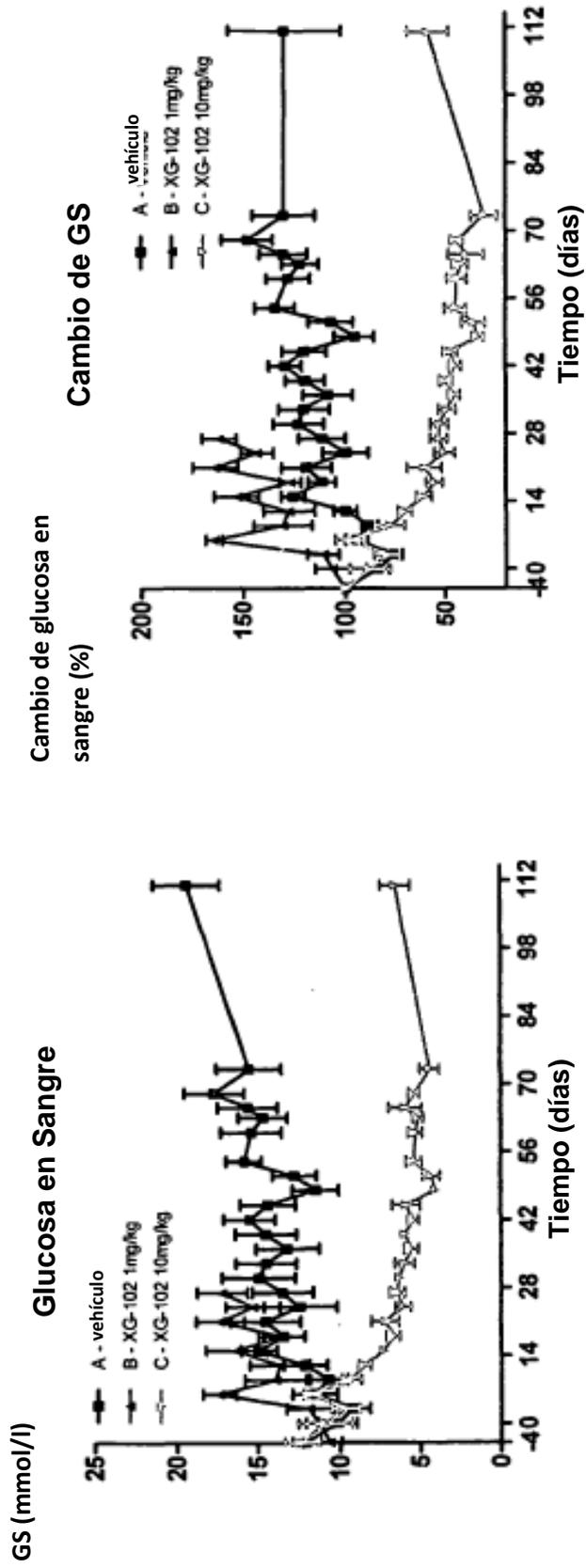


Fig. 15

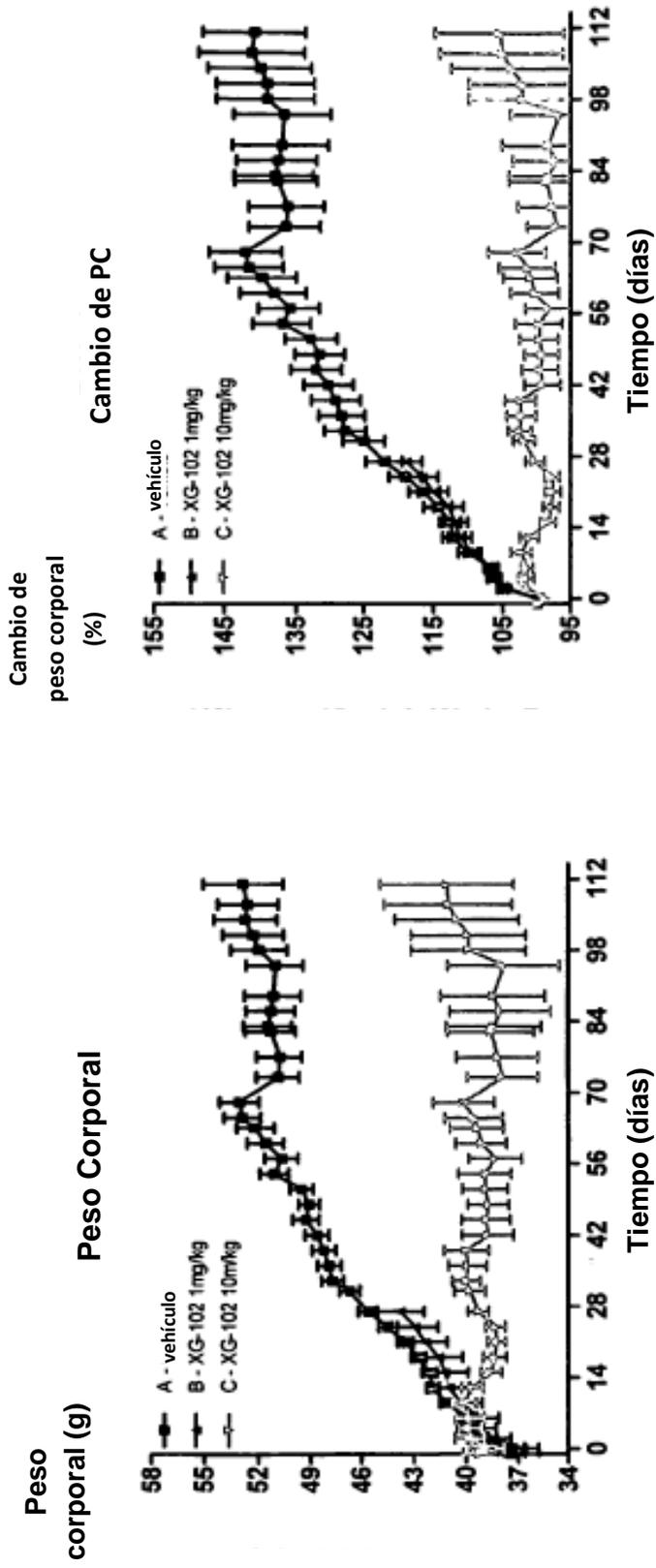


Fig. 16

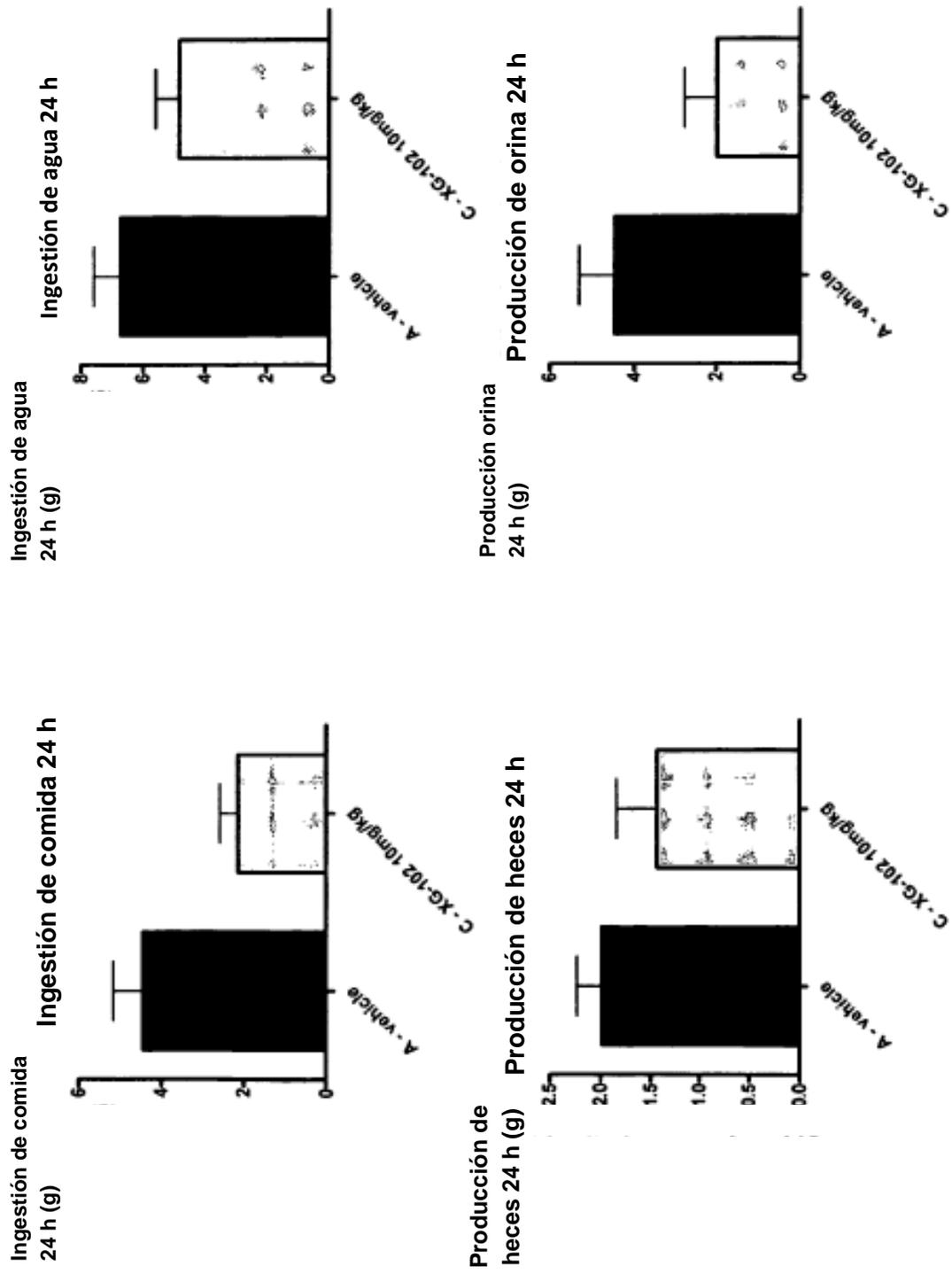


Fig. 17

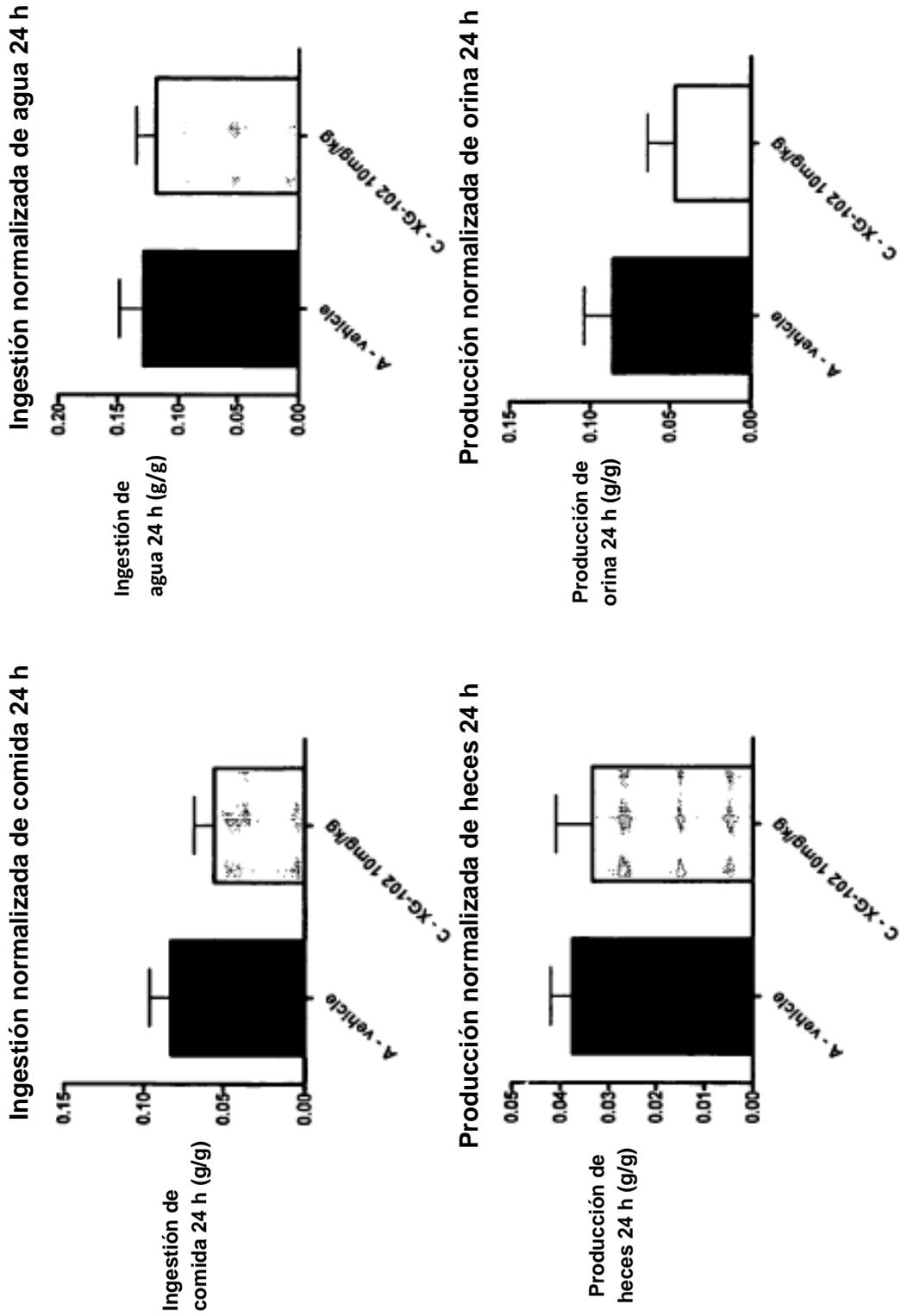


Fig. 18

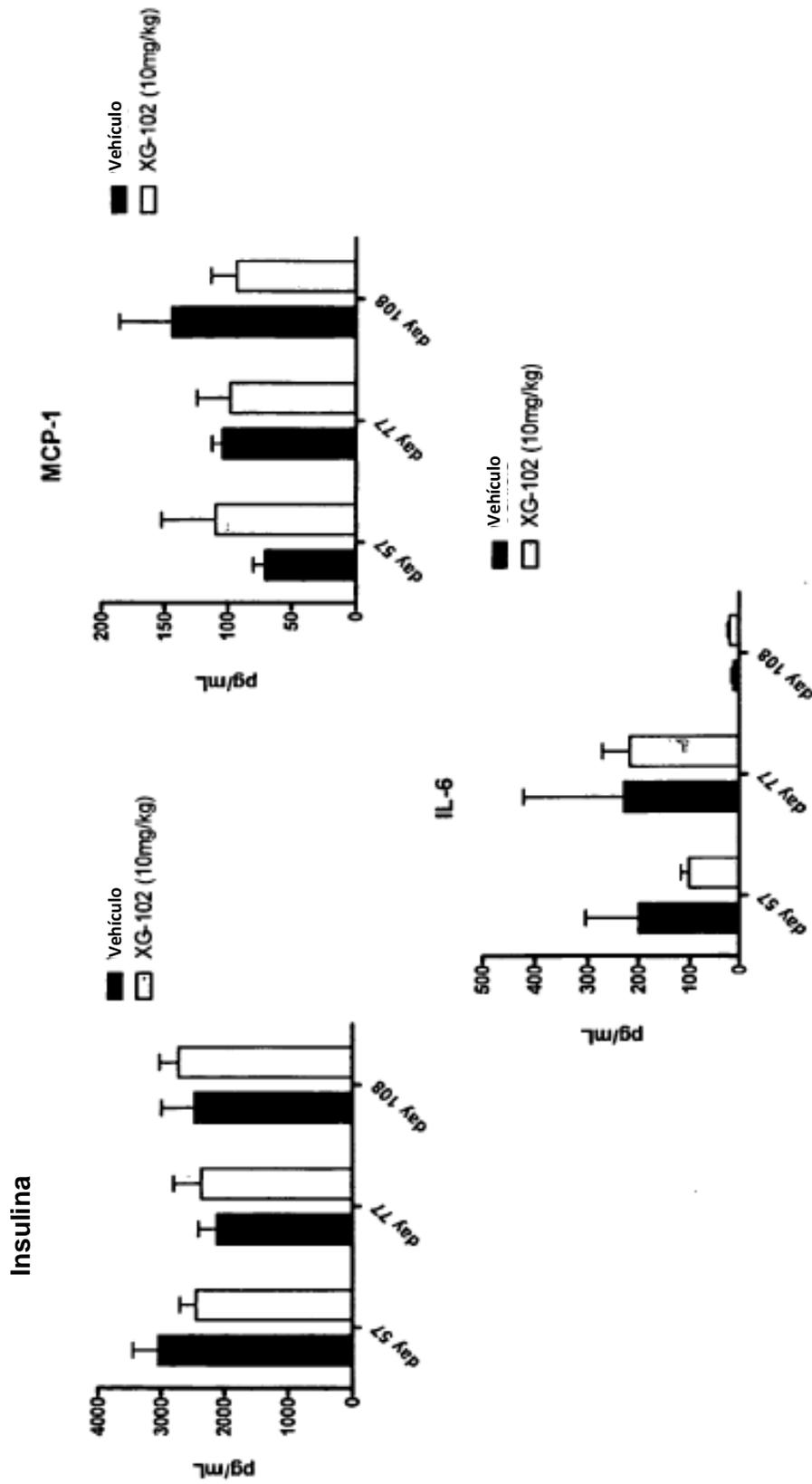


Fig. 19

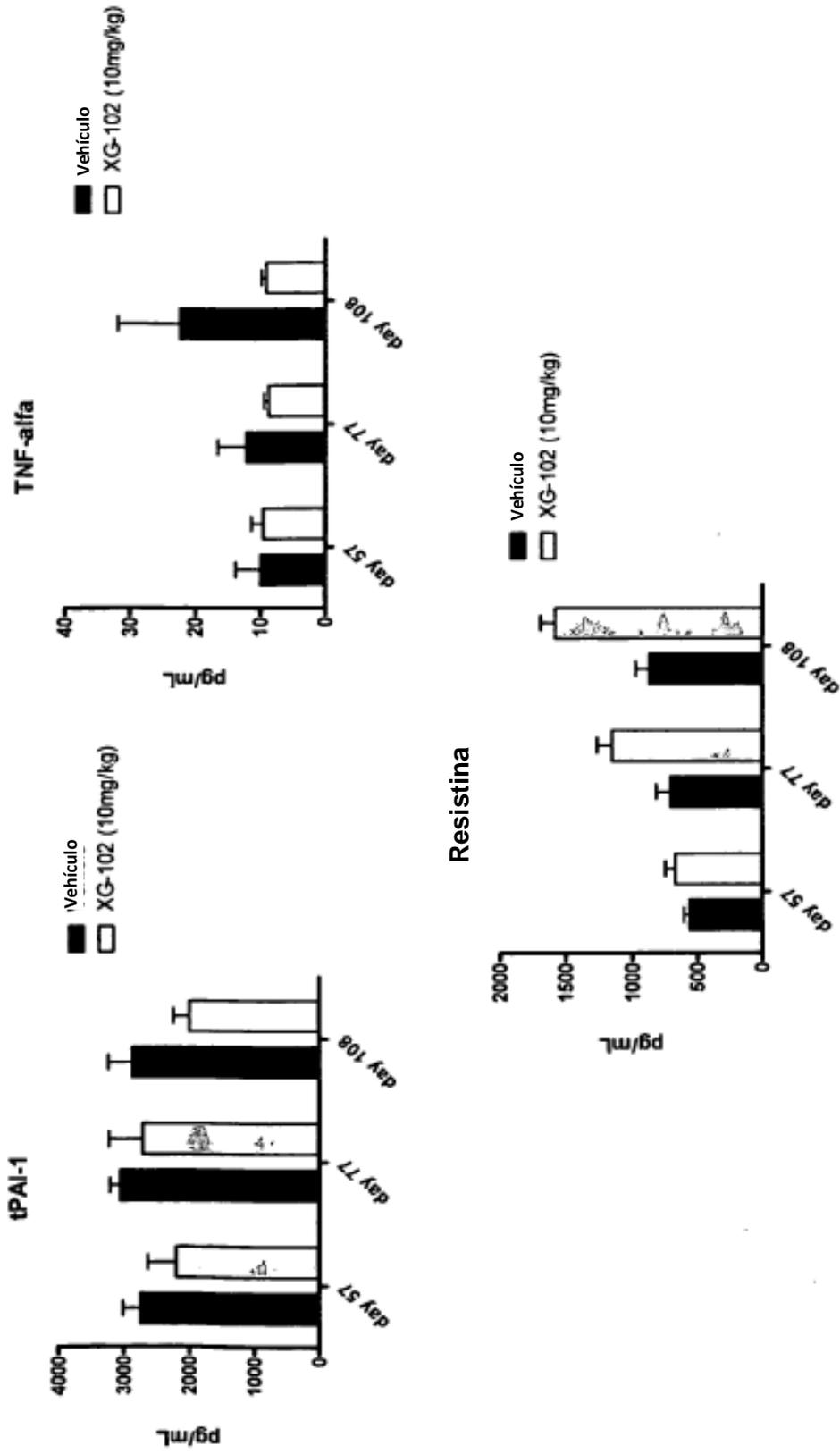


Fig. 20

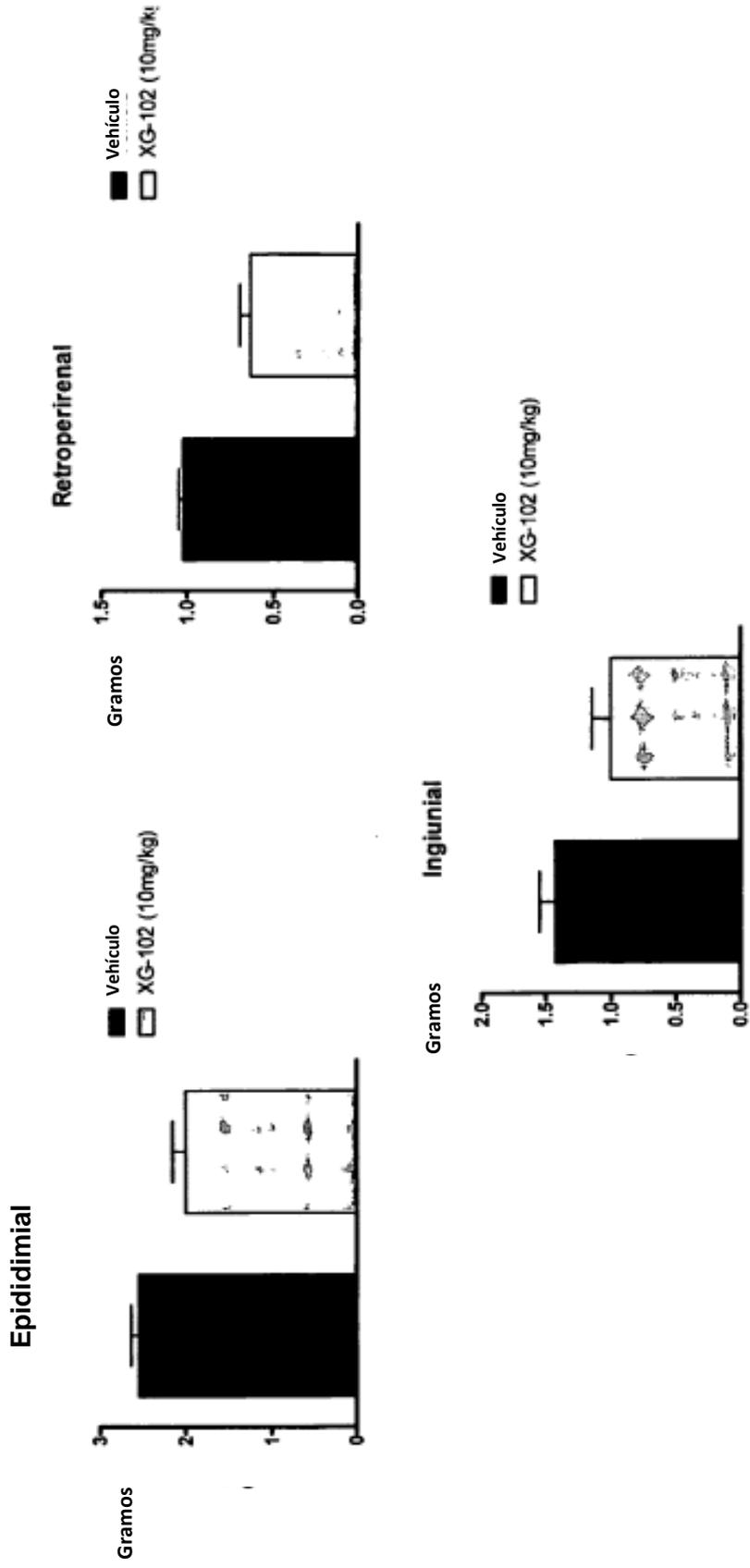


Fig. 21

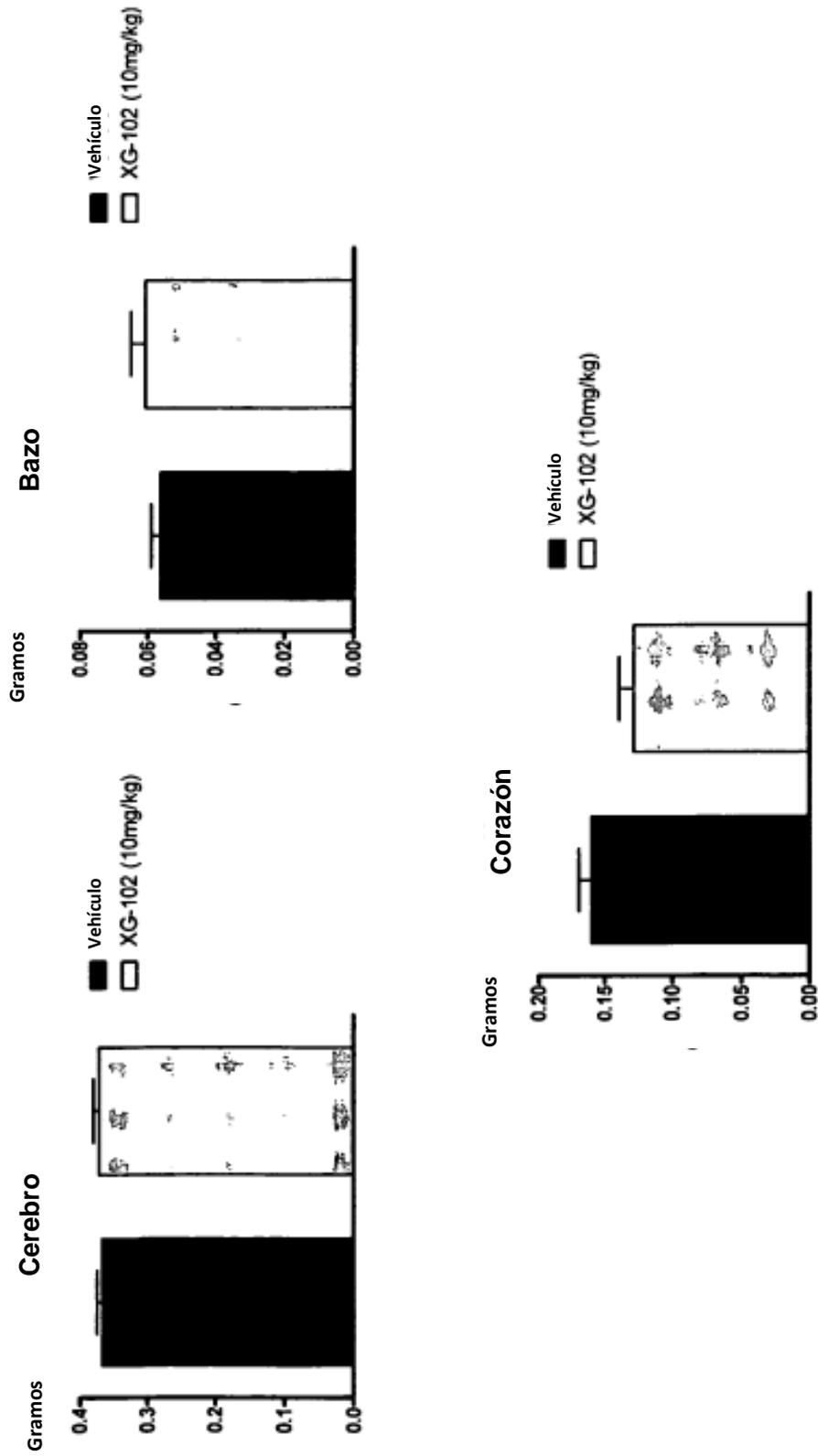


Fig. 22

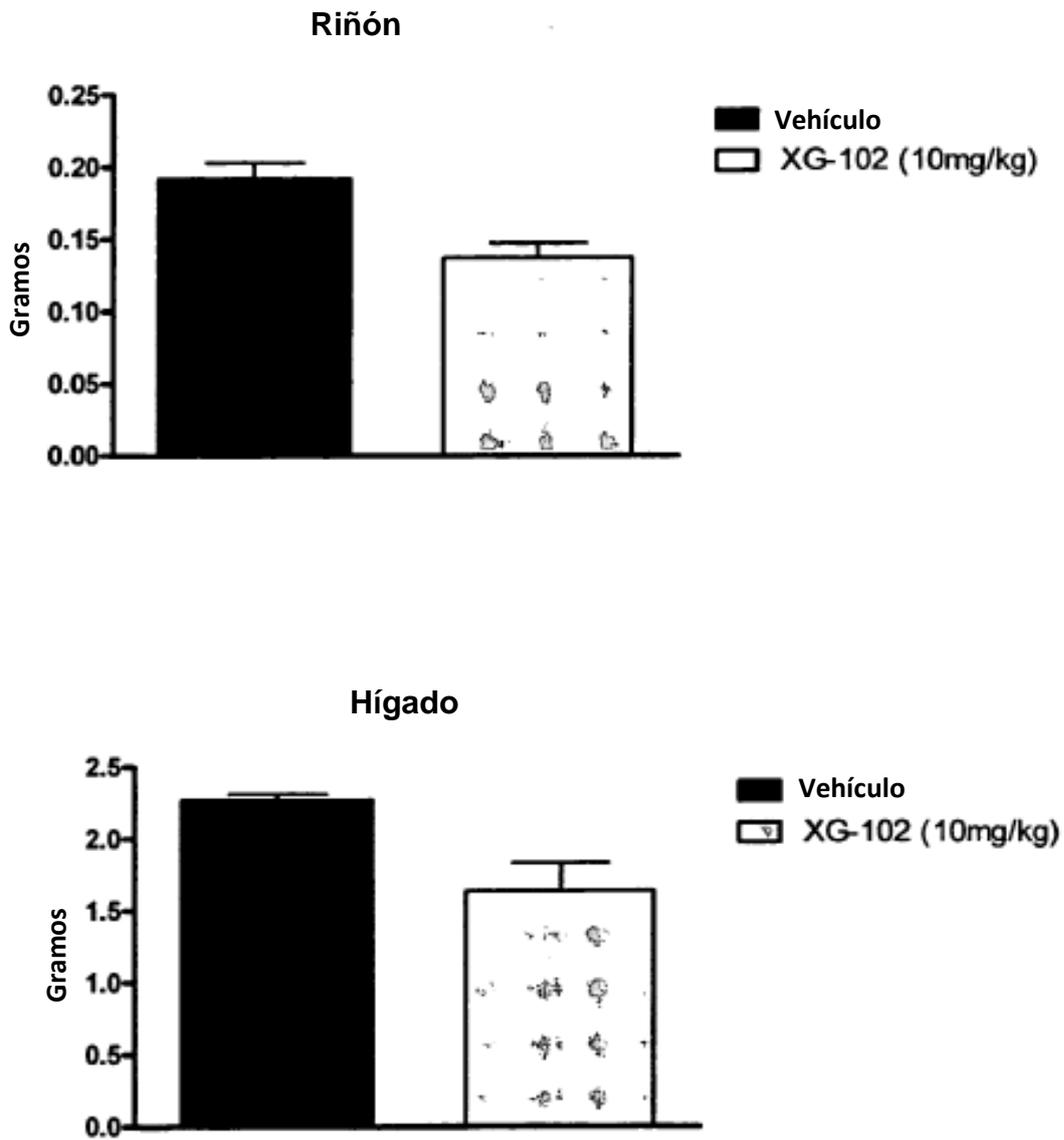
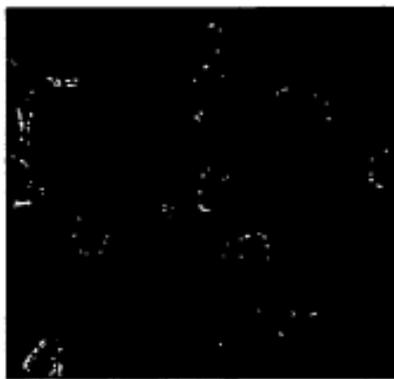


Fig. 23

Macrófago



DMEM Control



XG-102

Fig. 24

^{14}C -XG-102

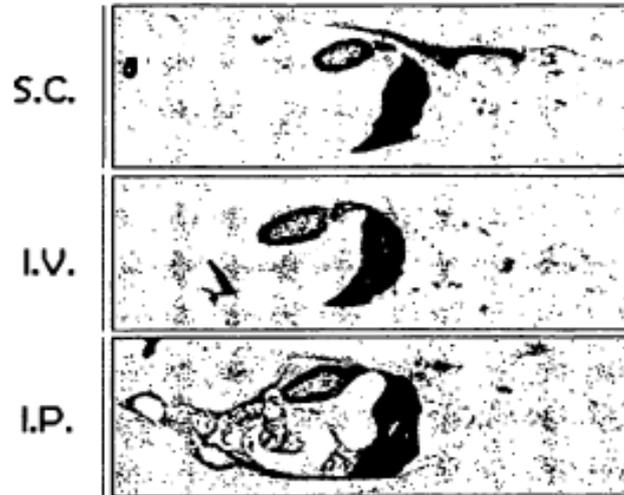


Fig. 25

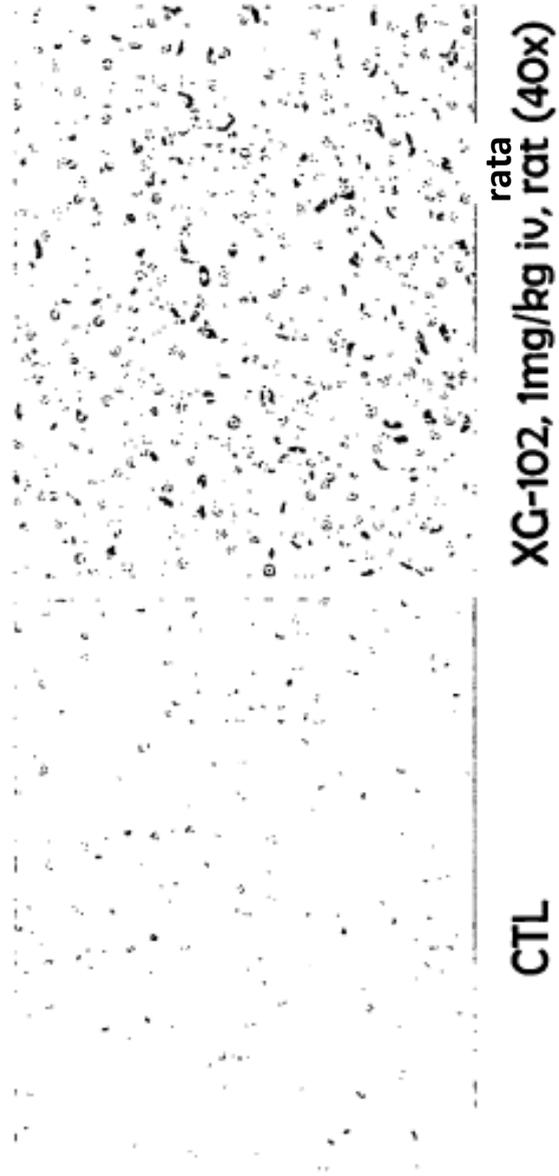


Fig. 26

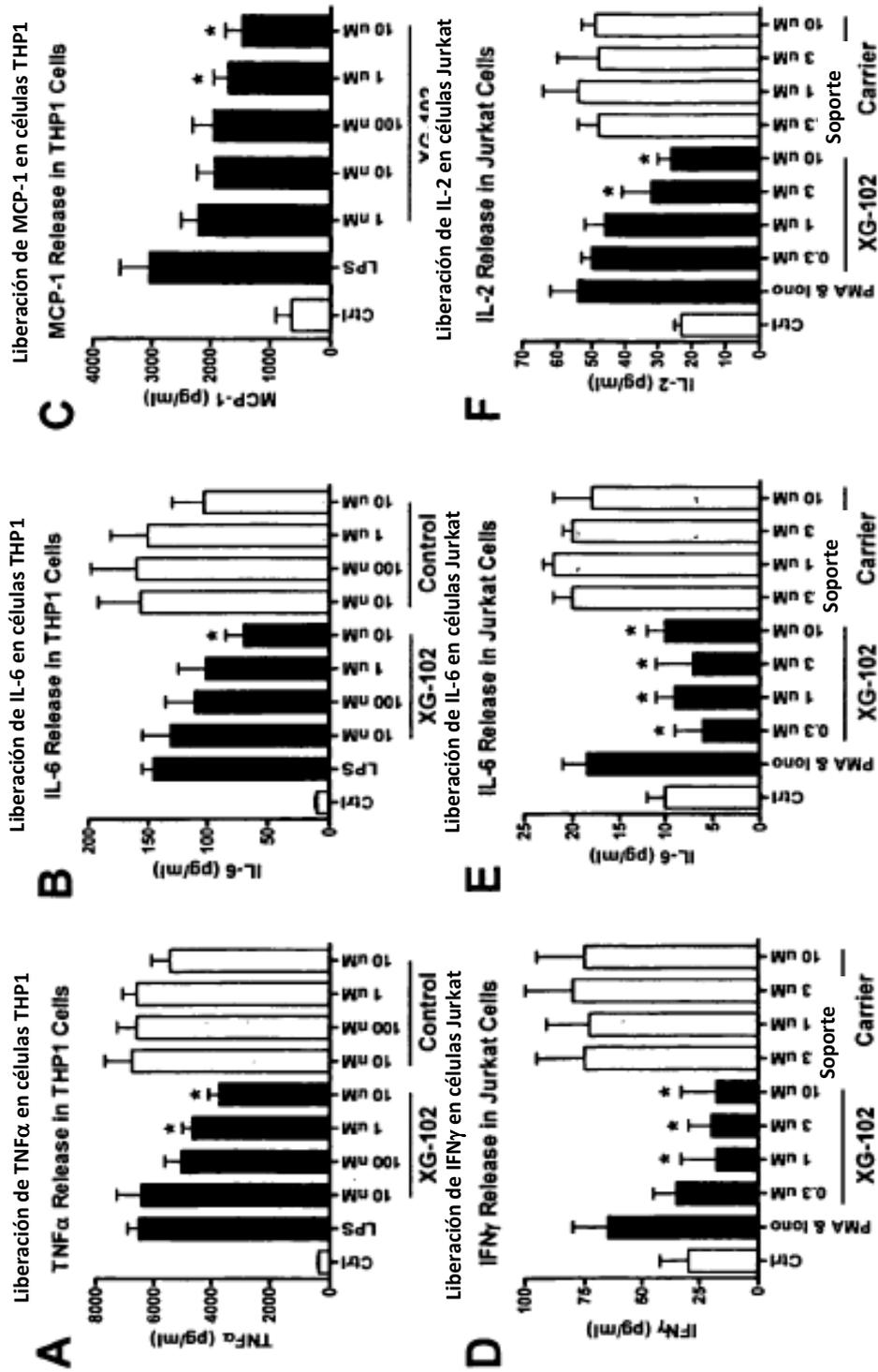


Fig. 27

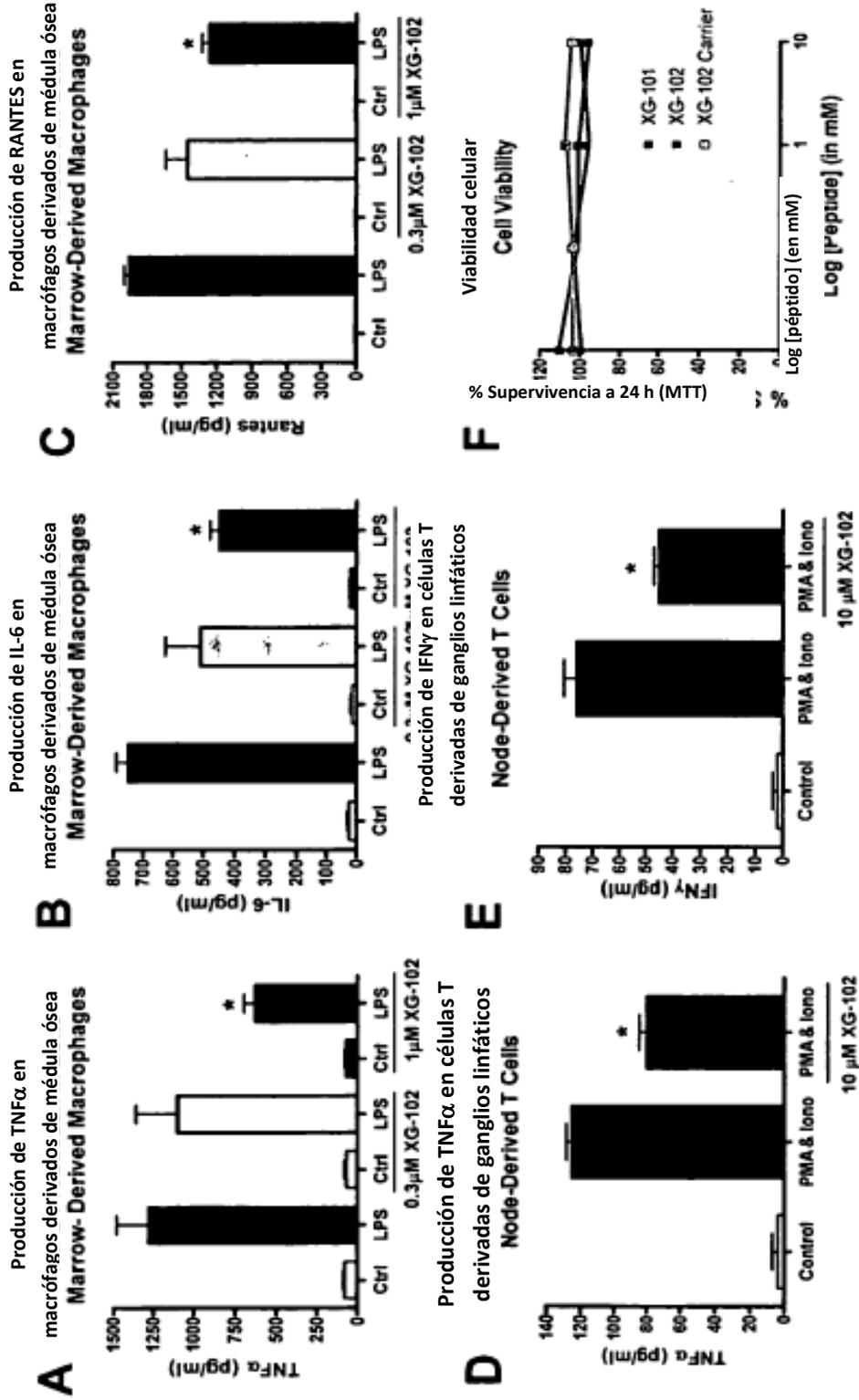


Fig. 28

ccgccccagc	tcagtccgaa	ccccgcggcg	gcggcggcct	cctccacacg	cctccacctc	60
cgccgccgcc	gccgccgccg	ccgcctcccg	cgctgctctc	cgcccggatg	gccaggctga	120
gcccgggaat	ggcggagcga	gagagcggcc	tgagcggggg	tgccgcgtcc	ccaccggccg	180
cttccccatt	cctgggactg	cacatcgcgt	cgctcccaa	tttcaggctc	acctatgata	240
tcagcctgga	ggagtttgag	gatgaagacc	tttcggagat	cactgatgag	tgtggcatca	300
gcctgcagtg	caaagacacc	ttgtctctcc	ggcccccgcg	cgccgggcta	ctgtctgcgg	360
gtagcagcgg	tagcgcgggg	agccggctgc	agccggagat	gctgcagatg	gacctgatcg	420
acgcggcaag	tgacctccg	ggcgcggagg	acgacgaaga	ggacgacgac	gagctcgctg	480
cccaacggcc	aggagtgggg	ccttccaaag	ccgagtctgg	ccaggagccg	gcgtctcgca	540
gccagggtca	gggccagggc	cccggcacag	gctgcggaga	cacctaccgg	cccaagaggc	600
ctaccacgct	caaccttttc	ccgcaggtgc	cgcggtctca	ggacacgctg	aataataact	660
ctttaggcaa	aaagcacagt	tggcaggacc	gtgtgtctcg	atcatcctcc	cctctgaaga	720
caggggagca	gacgcctcca	catgaacata	tctgcctgag	tgatgagctg	ccgccccagg	780
gcagtcctgt	tcccaccag	gatcgtggca	cttccaccga	cagcccttgt	cgccgtactg	840
cagccacca	gatggcacct	ccaagtggtc	cccctgccac	tgacactggt	ggccggggcc	900
actcccatcg	agatcggctc	atatcagcag	atgtgcggct	cgaggcgact	gaggagatct	960
acctgacccc	agtgcagagg	ccccagacc	ctgcagaacc	cacctccacc	ttcttgccac	1020
ccactgagag	ccggatgtct	gtcagctcgg	atcctgacc	tgccgcttac	tctgtaactg	1080
cagggcgacc	gcacccttcc	atcagtgaag	aggatgaggg	cttcgactgt	ctgtcatccc	1140
cagagcaagc	tgagccacca	ggtggagggt	ggcggggaag	cctcggggag	ccaccaccgc	1200
ctccacgggc	ctcactgagc	tcggacacca	gcgcaactgtc	ctacgactct	gtcaagtaca	1260
cactggtggt	ggatgagcat	gcccagcttg	agttggtgag	cctgcggcca	tgttttggag	1320
attacagtga	cgaaagcgac	tctgccactg	tctatgacaa	ctgtgcctct	gcctcctcgc	1380
cctacgagtc	agccattggt	gaggaatatg	aggaggcccc	tcaaccccgg	cctccacact	1440
gcctgtcaga	ggactccaca	ccggatgagc	ctgacgtcca	cttctctaag	aagtttctga	1500
atgtcttcat	gagtggccgc	tctcgttctc	ccagtgccga	gtcctttggg	ctgttctcct	1560
gtgtcatcaa	tggggaggag	catgagcaaa	cccacggggc	tatattcagg	tttgtgcctc	1620
ggcatgaaga	tgaacttgag	ctggaagtgg	acgaccctct	gctggtggag	ctgcaggcag	1680

Fig. 29

aagactattg gtatgaggcc tataacatgc gcactggagc ccgagggtgc ttcctgcct	1740
actatgccat tgaggtcacc aaggagcctg agcacatggc agcccttgcc aaaaacagcg	1800
actggattga ccagttccgg gtgaagttcc tgggctctgt ccaggttcct tatcacaagg	1860
gcaatgatgt cctctgtgct gctatgcaaa agatcgccac caccgcccgg ctcaccgtgc	1920
actttaacct gccctccagc tgtgtccttg aaatcagcgt taggggtgct aagataggtg	1980
tcaaagctga tgaagctcag gaggccaagg gaaataaatg tagccacttt ttccagctaa	2040
aaaacatctc tttctgtggg taccatccaa agaacaacaa gtactttggg tttatcacta	2100
agcaccctgc tgaccaccgg tttgcctgcc atgtctttgt gtctgaagat tccaccaaaag	2160
ccctggcaga gtctgtgggg cgtgcatttc agcagttcta caagcaattt gtggaatata	2220
cctgtcctac agaagatata tacttggagt agcagcaacc cccctctctg cagcccctca	2280
gccccaggcc agtactagga cagctgactg ctgacaggat gttgtactgc cacgagagaa	2340
tgggggagtg agggctggtg gggtcggggg gcaggggttt ggggagaggc agatgcagtt	2400
tattgtaata tatgggggta gattaatcta tggaggacag tacaggctct ctcggggctg	2460
gggaagggca gggctggggg gggggtcagg catctggcca caaaggggtc ccctagggac	2520
agaggcgctg caccatcctg ggcttgtttc atactagagg ccctggcttt ctggctcttg	2580
ggtcctgctt tgacaaagcc cagccacctg gaagtgtcac cttcccttgt ccacctcacc	2640
cagtgccttg agctcatgct gagcccaagc acctccgaag gactttccag taaggaaatg	2700
gcaacatgtg acagtgagac cctgttctca tctgtggggc tccggcagct ccgaccccca	2760
gcctggccag cacgctgacc ctggcaagct tgtgtgttca aagaaggaga gggccacagc	2820
aagccctgcc tgccagggaa ggttcctctc cagctggccc cagccaactg gtcactgtct	2880
tgtcacctgg ctactactat taaagtgcc a tttcttgtct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2940
aaaaaaaaactc gag	2953

Fig. 29 (cont.)

Met Ala Arg Leu Ser Pro Gly Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Ala Ser Pro Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His
 20 25 30
 Ile Ala Ser Pro Pro Asn Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu
 35 40 45
 Glu Phe Glu Asp Glu Asp Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile
 50 55 60
 Ser Leu Gln Cys Lys Asp Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly
 65 70 75 80
 Leu Leu Ser Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala
 85 90 95
 Glu Met Leu Gln Met Asp Leu Ile Asp Ala Ala Ser Asp Thr Pro Gly
 100 105 110
 Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Leu Ala Ala Gln Arg Pro
 115 120 125
 Gly Val Gly Pro Ser Lys Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg
 130 135 140
 Ser Gln Gly Gln Gly Gln Gly Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr
 145 150 155 160
 Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
 165 170 175
 Ser Gln Asp Thr Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp
 180 185 190
 Gln Asp Arg Val Ser Arg Ser Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln
 195 200 205
 Thr Pro Pro His Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln
 210 215 220
 Gly Ser Pro Val Pro Thr Gln Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro
 225 230 235 240
 Cys Arg Arg Thr Ala Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Ser Gly Pro Pro
 245 250 255

Fig. 30

Ala Thr Ala Pro Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ser Ile
 260 265 270

Ser Ala Asp Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro
 275 280 285

Val Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Glu Pro Thr Ser Thr Phe Leu Pro
 290 295 300

Pro Thr Glu Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala
 305 310 315 320

Tyr Ser Val Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Asp
 325 330 335

Glu Gly Phe Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Gln Ala Glu Pro Pro Gly
 340 345 350

Gly Gly Trp Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala
 355 360 365

Ser Leu Ser Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr
 370 375 380

Thr Leu Val Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg
 385 390 395 400

Pro Cys Phe Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr
 405 410 415

Asp Asn Cys Ala Ser Ala Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu
 420 425 430

Glu Tyr Glu Glu Ala Pro Gln Pro Arg Pro Pro Thr Cys Leu Ser Glu
 435 440 445

Asp Ser Thr Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu
 450 455 460

Asn Val Phe Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ser Ala Glu Ser Phe
 465 470 475 480

Gly Leu Phe Ser Cys Val Ile Asn Gly Glu Glu His Glu Gln Thr His
 485 490 495

Arg Ala Ile Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu
 500 505 510

Fig. 30 (cont.)

Glu Val Asp Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp
 515 520 525
 Tyr Glu Ala Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala
 530 535 540
 Tyr Tyr Ala Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu
 545 550 555 560
 Ala Lys Asn Ser Asp Trp Ile Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly
 565 570 575
 Ser Val Gln Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala
 580 585 590
 Met Gln Lys Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro
 595 600 605
 Pro Ser Ser Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly
 610 615 620
 Val Lys Ala Asp Glu Ala Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His
 625 630 635 640
 Phe Phe Gln Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn
 645 650 655
 Asn Lys Tyr Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe
 660 665 670
 Ala Cys His Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu
 675 680 685
 Ser Val Gly Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr
 690 695 700
 Thr Cys Pro Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu
 705 710

Fig. 30 (cont.)

Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ala Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His Ile Ala Ser Pro Pro Asn
 20 25 30
 Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu Glu Phe Glu Asp Glu Asp
 35 40 45
 Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile Ser Leu Gln Cys Lys Asp
 50 55 60
 Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly Leu Leu Ser Ala Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala Glu Met Leu Gln Met Asp Leu
 85 90 95
 Ile Asp Ala Thr Gly Asp Thr Pro Gly Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp
 100 105 110
 Asp Asp Glu Glu Arg Ala Ala Arg Arg Pro Gly Ala Gly Pro Pro Lys
 115 120 125
 Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg Gly Gln Gly Gln Ser Gln
 130 135 140
 Gly Gln Ser Gln Gly Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg
 145 150 155 160
 Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
 165 170 175
 Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp Gln Asp Arg Val
 180 185 190
 Ser Arg Ser Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln Thr Pro Pro His
 195 200 205
 Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln Ser Gly Pro Ala
 210 215 220
 Pro Thr Thr Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro Cys Arg Arg Ser
 225 230 235 240
 Thr Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Gly Gly Pro Pro Ala Ala Pro Pro
 245 250 255

Fig. 31

Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ile His Tyr Gln Ala Asp
 260 265 270
 Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro Val Gln Arg
 275 280 285
 Pro Pro Asp Ala Ala Glu Pro Thr Ser Ala Phe Leu Pro Pro Thr Glu
 290 295 300
 Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala Tyr Pro Ser
 305 310 315 320
 Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Glu Gly Phe
 325 330 335
 Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Glu Pro Pro Gly Gly Gly Trp
 340 345 350
 Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Ser Leu Ser
 355 360 365
 Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr Thr Leu Val
 370 375 380
 Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg Pro Cys Phe
 385 390 395 400
 Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr Asp Asn Cys
 405 410 415
 Ala Ser Val Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu Glu Tyr Glu
 420 425 430
 Glu Ala Pro Arg Pro Gln Pro Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asp Ser Thr
 435 440 445
 Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu Asn Val Phe
 450 455 460
 Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ser Ala Glu Ser Phe Gly Leu Phe
 465 470 475 480
 Ser Cys Ile Ile Asn Gly Glu Glu Gln Glu Gln Thr His Arg Ala Ile
 485 490 495
 Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu Glu Val Asp
 500 505 510

Fig. 31 (cont.)

Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp Tyr Glu Ala
 515 520 525

Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala Tyr Tyr Ala
 530 535 540

Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu Ala Lys Asn
 545 550 555 560

Ser Asp Trp Val Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly Ser Val Gln
 565 570 575

Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala Met Gln Lys
 580 585 590

Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro Pro Ser Ser
 595 600 605

Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly Val Lys Ala
 610 615 620

Asp Asp Ser Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His Phe Phe Gln
 625 630 635 640

Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn Asn Lys Tyr
 645 650 655

Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe Ala Cys His
 660 665 670

Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu Ser Val Gly
 675 680 685

Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr Thr Cys Pro
 690 695 700

Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu
 705 710

Fig. 31 (cont.)

atggcggagc gagaaagcgg cggcctggga gggggggccg cgtccccgcc cgccgcctcc	60
ccgttcctgg ggctgcacat cgcttcgcct cccaatttca ggctcaccca tgacatcagc	120
ctggaggagt ttgaggatga agacctctcg gagatcactg atgagtgtgg catcagctta	180
cagtgcaaag acaccctgtc cttacggccc ccgtgcgccg ggctgctctc tgcgggcggc	240
ggcggcgcgg ggagccggtt gcaggccgag atgctgcaga tggacctgat cgacgcgacg	300
ggggacactc ccggggccga ggacgacgag gaggacgacg acgaggagcg cgcggcccgg	360
cggccgggag cggggccgcc caaggccgag tccggccagg agccggcgtc ccgcgccag	420
ggccagagcc aaggccagag ccagggcccg ggcagcgggg acacgtaccg gcccaagcgg	480
cccaccacgc tcaacctctt tccgcagggt ccgcggtctc aggacacact gaataataat	540
tctctgggca aaaagcacag ttggcaggat cgggtgtctc gatcatcctc acccctgaag	600
acaggggagc agacaccacc gcatgaacac atctgcctga gcgatgagct gccccccag	660
agcggccccc cccccaccac agatcgaggc acctccaccg acagcccttg ccgcccgacg	720
acagccacc agatggcacc tccgggtggt cccctgctg ccccgctgg gggtcggggc	780
cactcgcac gagaccgaat cactaccag gccgatgtgc gactagaggc cactgaggag	840
atctacctga cccagtgca gaggcccca gacgctgcag agcccacctc cgcttctctg	900
ccgcccactg agagccggat gtcagtcacg tccgatccag acctgcccgc ctaccctcc	960
acggcagggc gggccacccc ctccatcagt gaagaggaag agggcttca ctgcctgtcg	1020
tccccagagc gggctgagcc cccaggcggg ggggtggcgg ggagcctggg ggagccgccg	1080
ccacctccac gggcctctct gagctcggac accagcggcc tgtcctatga ctctgtcaag	1140
tacacgctgg tggtagatga gcatgcacag ctggagctgg tgagcctgcg gccgtgcttc	1200
ggagactaca gtgacgagag tgactctgcc accgtctatg acaactgtgc ctccgtctcc	1260
tcgccctatg agtcggccat cggagaggaa tatgaggagg ccccgccgcc ccagccccct	1320
gcctgcctct ccgaggactc cagcctgat gaaccgcag tccatttctc caagaaattc	1380
ctgaacgtct tcatgagtgg ccgctcccgc tcctccagtg ctgagtcctt cgggctgttc	1440
tcctgcatca tcaacgggga ggagcaggag cagaccacc gggccatatt caggtttgtg	1500
cctcgacacg aagacgaact tgagctggaa gtggatgacc ctctgctagt ggagctccag	1560
gctgaagact actggtacga ggcctacaac atgcgactg gtgccccggg tgtctttcct	1620
gcctattacg ccatcgaggc caccaaggag cccgagcaca tggcagccct ggccaaaaac	1680
agtgactggg tggaccagtt ccgggtgaag ttctctgggt cagtccaggt tccctatcac	1740

Fig. 32

aagggcaatg	acgtcctctg	tgctgctatg	caaaagattg	ccaccacccg	ccggetcacc	1800
gtgcacttta	acccgccctc	cagctgtgtc	ctggagatca	gcgtgcgggg	tgtgaagata	1860
ggcgtcaagg	ccgatgactc	ccaggaggcc	aaggggaata	aatgtagcca	ctttttccag	1920
ttaaaaaaca	tctctttctg	cggatatcat	ccaaagaaca	acaagtactt	tgggttcac	1980
accaagcacc	ccgccgacca	ccggtttgcc	tgccacgtct	ttgtgtctga	agactccacc	2040
aaagccctgg	cagagtccgt	ggggagagca	ttccagcagt	tctacaagca	gtttgtggag	2100
tacacctgcc	ccacagaaga	tatctacctg	gagtag			2136

Fig. 32 (cont.)