

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 708**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2006 E 11003985 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2418217**

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

30 Prioridad:

12.09.2005 WO PCT/EP2005/009782

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

26.04.2016

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

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 708 T3

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

Descripción

Inhibidores peptídicos de la vía de transducción de la señal de JNK con permeabilidad celular

5 La presente invención se refiere a inhibidores de la proteína-quinasa y, más específicamente, a inhibidores de la proteína-quinasa c-Jun amino terminal. La presente invención proporciona péptidos quiméricos y también composiciones farmacéuticas para el tratamiento de fisiopatologías asociadas a la señalización de JNK.

10 La quinasa c-Jun amino terminal (JNK) es un miembro del grupo activado por estrés de las proteína-quinasa activadas por mitógeno (MAP). Estas quinasa se han relacionado con el control del crecimiento y la diferenciación celular y, en general, con las respuestas celulares a estímulos ambientales. La vía de transducción de las señales de JNK se activa en respuesta al estrés ambiental y por la intervención de diversas clases de receptores de la superficie celular. Estos receptores pueden incluir receptores de citoquina, de serpentina y tirosina-quinasa receptoras. En células de mamífero, la JNK se relaciona con procesos biológicos tales como la transformación oncogénica y la mediación en respuestas adaptativas al estrés ambiental. La JNK también se asocia a la modulación de las respuestas inmunitarias, incluyendo la maduración y diferenciación de inmunocitos, y con la ejecución de la muerte celular programada en células identificadas para la destrucción por el sistema inmunológico. Esta propiedad única hace que las señales de JNK sean un objetivo prometedor para el desarrollo de una intervención farmacológica. Entre otros trastornos neurológicos, las señales de JNK tienen un papel particular en los ataques isquémicos y la enfermedad de Parkinson.

20 Una propuesta para combatir aquellos trastornos claramente relacionados con las señales de JNK es la provisión de inhibidores de la vía de señalización de JNK. Estos inhibidores, tal como son conocidos en el estado actual de la técnica, incluyen en particular inhibidores quinasa aguas arriba (por ejemplo CEP-1347), inhibidores químicos de JNK pequeños (SP600125 y AS601245) que afectan directamente a la actividad quinasa, por ejemplo compitiendo con el sitio de unión del ATP de la proteína-quinasa, e inhibidores peptídicos de la interacción entre JNK y sus sustratos (D-JNKI e I-JIP) (véase, por ejemplo, Kuan y col., Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders, febrero de 2005, vol. 4, n° 1, pp. 63-67(5)).

30 El inhibidor aguas arriba de la quinasa CEP-1347 (KT7515) es un inhibidor semisintético de la familia de las quinasa de linaje mixto. El CEP-1347 (KT7515) promueve la supervivencia neuronal a dosis que inhiben la activación de las quinasa c-Jun amino terminales (JNK) en cultivos embrionarios primarios y células PC12 diferenciadas después de retirada trófica y en ratones tratados con 1-metil-4-feniltetrahidropiridina. Además, se ha observado que el CEP-1347 (KT7515) puede promover la supervivencia a largo plazo de neuronas cultivadas simpáticas, ciliares y motoras de los ganglios de la raíz dorsal embrionaria de pollos (véase, por ejemplo, Borasio y col., Neuroreport. 9(7): 1435-1439, 11 de mayo de 1998).

35 Se ha comprobado que el inhibidor químico pequeño de JNK SP600125 reduce los niveles de fosforilación de c-Jun, protegiendo las neuronas dopaminérgicas frente a la apoptosis, y restaura en parte el nivel de dopamina en caso de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP en ratones C57BL/6N (Wang y col., Neurosci Res. Febrero de 2004; 48(2); 195-202). Estos resultados indican además que la vía de JNK es el principal mediador de los efectos neurotóxicos del MPTP *in vivo* y que la inhibición de la actividad de JNK puede constituir una estrategia nueva y eficaz para tratar la enfermedad de Parkinson.

40 Otro ejemplo de inhibidores químicos pequeños es el inhibidor de JNK AS601245 arriba mencionado. El AS601245 inhibe la vía de señalización de JNK y promueve la supervivencia celular después de isquemia cerebral. El AS601245 ha proporcionado *in vivo* una protección significativa contra la pérdida retrasada de neuronas CA1 hipocámpales en un modelo de jerbo de isquemia global transitoria. Este efecto está mediado por la inhibición de JNK y, por consiguiente, por la expresión y fosforilación de c-Jun (véase, por ejemplo, Carboni y col., Pharmacol Exp Ther. Julio de 2004; 310(1):25-32. Epub 26 de febrero de 2004).

45 Una tercera clase de inhibidores de la vía de señalización de JNK es la de los inhibidores peptídicos de la interacción entre JNK y sus sustratos, tal como se ha menciona anteriormente. Como punto de partida para la construcción de estos péptidos inhibidores de JNK se puede utilizar una alineación de secuencia de proteínas JNK naturales. Típicamente, estas proteínas comprenden dominios de unión de JNK (JBD) y se encuentran en diversas proteínas de unión de insulina (IB), tales como IB1 o IB2. El resultado de un ejemplo de alineación de secuencia es, por ejemplo, una alineación de secuencia entre los dominios de unión de JNK de IB1 [SEQ ID N°: 13], IB2 [SEQ ID N°: 14], c-Jun [SEQ ID N°: 15] y ATF2 [SEQ ID N°: 16] (véanse, por ejemplo, las figuras 1A-1C). Una alineación de este tipo revela una secuencia de 8 aminoácidos parcialmente conservada (véase, por ejemplo, la figura 1A). Una comparación de los JBD de IB1 e IB2 revela además dos bloques de siete y tres aminoácidos que están altamente conservados entre las dos secuencias.

- Por ejemplo, en el documento WO 01/27268 se dan a conocer secuencias construidas en base a una alineación de este tipo. El documento WO 01/27268 describe péptidos de fusión pequeños con permeabilidad celular que comprenden la llamada secuencia de permeabilidad celular TAT derivada de la secuencia de tráfico básica de la proteína VIH-TAT y una secuencia inhibidora de IB1 de un mínimo de 20 aminoácidos.
- 5 Los dos componentes están unidos entre sí de forma covalente. Ejemplos de inhibidores (y actualmente los únicos) de la vía de señalización de MAPK-JNK descritos en el documento WO 01/27268 son L-JNK11 (péptido inhibidor de JNK compuesto por aminoácidos L) o péptidos D-JNK11 resistentes a la proteasa (péptido inhibidor de JNK compuesto por aminoácidos D no nativos). Estos péptidos inhibidores de JNK (JNK1) son específicos para JNK (JNK1, JNK2 y JNK3). A diferencia de estos inhibidores de compuestos
- 10 pequeños arriba indicados, las secuencias inhibidoras indicadas en el documento WO 01/27268, por ejemplo JNK11, inhiben esencialmente la interacción entre JNK y su sustrato. El péptido de fusión es transportado eficientemente a las células mediante su secuencia de tráfico derivada de TAT. Debido a las nuevas propiedades obtenidas mediante el componente de tráfico, los péptidos de fusión son transportados activamente al interior de las células, donde se mantienen efectivos hasta la degradación proteolítica.
- 15 No obstante, los péptidos de acuerdo con el documento WO 01/27268 siguen siendo accesibles por las fosforilasas (quinasas). Cualquier aminoácido de un péptido diana para quinasas y, por consiguiente, susceptible a fosforilación, representa un factor importante para inactivar estos péptidos. Por ello, un primer objeto de la presente invención es proporcionar nuevas secuencias inhibidoras para la vía de señalización de JNK que conserven las propiedades funcionales de los péptidos descritos en el documento WO 01/27268,
- 20 pero que proporcionen una mayor estabilidad frente a las fosforilasas (quinasas).

Además, las secuencias inhibidoras de acuerdo con el documento WO 01/27268 requieren un costoso paso de recuperación y purificación, en particular si se preparan en cantidades a gran escala (por ejemplo, para la producción industrial). Por consiguiente, un segundo objeto de la presente invención es proporcionar secuencias inhibidoras que posibiliten una producción y una recuperación más sencilla y rentable que las del

25 estado actual de la técnica.

Estos objetos se resuelven mediante un péptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 1.

Preferentemente, el péptido quimérico de la invención se une por su secuencia inhibidora de JNK a JNK y/o inhibe la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun o ATF2 (véanse, por ejemplo, SEQ ID N°: 15 y 16, respectivamente) o Elk1.

- 30 La secuencia inhibidora de JNK del péptido quimérico de la invención está compuesta exclusivamente por aminoácidos D y se corresponden a la SEQ ID NO: 2. La secuencia inhibidora de JNK compuesta por aminoácidos D es una secuencia retro-inversa D no nativa de las secuencias anteriores (nativas) inhibidora de SEQ ID NO: 1. El concepto "secuencia retro-inversa" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal donde la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo aminoácido está invertida (véase, por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368,744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368,692-693 (1994)). La ventaja de combinar enantiómeros D y síntesis inversa es que se intercambian las posiciones de los grupos carbonilo y amino de cada enlace amida, conservándose la posición de los grupos de cadena lateral de cada carbono alfa. A no ser que se indique específicamente otra cosa, se supone que cualquier péptido o secuencia de aminoácidos L dada de acuerdo con la presente invención se puede convertir en un
- 35 péptido o secuencia retro-inversa D mediante la síntesis de la inversión de secuencia o péptido del péptido o secuencia de aminoácidos L nativa correspondiente.
- 40

Las secuencias retro-inversas D tal como se han definido tienen diversas propiedades útiles. Por ejemplo, las secuencias retro-inversas D de la invención penetran en las células con la misma eficiencia que las secuencias de aminoácidos L, siendo las secuencias retro-inversas D de la invención más estables que las

45 secuencias de aminoácidos L correspondientes.

Las secuencias inhibidoras de JNK pueden comprender o consistir en al menos una secuencia retro-inversa D de acuerdo con la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-DQXXXXXXXXLXLTPR-X}_n^a\text{-X}_n^b\text{-COOH}$ [SEQ ID N°: 4]. Tal como se emplea en este contexto, X_n^a , X_n^b y X_n^c son como se ha definido arriba (preferentemente representando D aminoácidos), donde X_n^b preferentemente representa un tramo de residuos contiguos

50 derivados de la SEQ ID NO: 2 o 4. El segundo dominio del péptido quimérico de la invención consiste en secuencias inhibidoras de JNK (secuencia retro-inversa D) de acuerdo con la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-DQSRPQVPLNLTTPRKPR-COOH}$ [SEQ ID NO: 2].

Las secuencias inhibidoras de JNK como se describen más arriba se muestran en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-4). La tabla indica el nombre de las secuencias inhibidoras de JNK de la invención, así como su número de identificación de secuencia, su longitud y la secuencia de aminoácidos. Además, se muestran secuencias del

55

estado anterior de la técnica de acuerdo con el documento WO 01/27268 (SEQ ID N°: 17-26) con fines comparativos.

Tabla 1

| Nombre Seq./ péptido | SEQ ID N° | aa | Secuencia |
|-------------------------|-----------|----|--|
| L-IB1 (s) | 1 | 19 | RPKRPTTLNL FPQVPRSQD (NH ₂ -RPKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH) |
| D-IB1 (s) | 2 | 19 | DQSRPVQPF LNTTPRKPR (NH ₂ -DQSRPVQPF LNTTPRKPR-COOH) |
| L-IB (genérico) (s) | 3 | 18 | XRPTTLXLXX XXXXXQDX (NH ₂ -X _n ^b -X _n ^a -RPTTLXLXXXXXXXXQD-X _n ^b -COOH) |
| D-IB (genérico) (s) | 4 | 18 | XDQXXXXXXXX LXLTPRX (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 | RRRQRRKRG (NH ₂ -RRRQRRKRG-COOH) |
| L-genérico-TAT (s) | 7 | 17 | XXXXRKKRRRQ RRRXXXX (NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -COOH) |
| D-genérico-TAT (s) | 8 | 17 | XXXXRRRQRR KKRXXXX (NH ₂ -X _n ^b -RRRQRRKKR-X _n ^b -COOH) |
| L-TAT-IB1 (s) | 9 | 31 | GRKKRRQRRR PPRPKRPTTL NLFQVPRSQ D (NH ₂ -GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH) |
| L-TAT-IB (genérico) (s) | 10 | 38 | XXXXXXXXRKK RRQRRXXXX XRPTTLXLXX XXXXXQDX (NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -X _n ^a -RPTTLXLXXXXXXXXQD-X _n ^b -COOH) |
| D-TAT-IB1 (s) | 11 | 31 | DQSRPVQPF LNTTPRKPRP PRRRQRRKRG G (NH ₂ -DQSRPVQPF LNTTPRKPRPPRRRQRRKRG-COOH) |
| D-TAT-IB (genérico) (s) | 12 | 38 | XDQXXXXXXXX LXLTPRXXX XXRRRQRRK RXXXXXXXX (NH ₂ -X _n ^b -DQXXXXXXXXLXLTPR-X _n ^a -X _n ^b -RRRQRRKKR-X _n ^b -COOH) |
| IB1-largo | 13 | 29 | PGTGCDTYR PKRPTTLNLF PQVPRSQDT |
| IB2-largo | 14 | 27 | IPSPSVEEPH KHRPTTLRLT TLGAQDS |
| c-Jun | 15 | 29 | GAYGYSNPKI LKQSMTLNLA DPVGNLKP |
| ATF2 | 16 | 29 | TNEDHLAVHK HKHEMTLKFV PARNSVIV |
| L-IB1 | 17 | 23 | DTYRPKRPTT LNLFPQVPRS QDT |
| D-IB1 | 18 | 23 | TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTD |
| L-IB (genérico) | 19 | 9 | XRPTTLXLXX XXXXXQDS/TX |
| D-IB (genérico) | 20 | 19 | XS/TDQXXXXXXXX XLXLTPRX |
| L-genérico-TAT | 21 | 17 | XXXXRKKRRRQ RRRXXXX |
| D-genérico-TAT | 22 | 17 | XXXXRRRQRR KKRXXXX |
| L-TAT-IB1 | 23 | 35 | GRKKRRQRRR PPDYRPKRP TTLNLFQVP RSQDT |
| L-TAT-IB (genérico) | 24 | 42 | XXXXXXXXRKK RRQRRXXXX XXXXRPTTLX LXXXXXXXXQD S/TX |
| D-TAT-IB1 | 25 | 35 | TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTDPPRRRQR RKKRG |
| D-TAT-IB (genérico) | 26 | 42 | XT / SDQXXXXXXXX XLXLTPRXX XXXXXXRRRQ RRKKRXXXXX XX |

(En la Tabla 1 se muestran ejemplos de secuencia y sus fórmulas genéricas para SEQ ID N°: 1, 2, 5, 6, 9 y 11 y SEQ ID N°: 3, 4, 7, 8, 10 y 12, respectivamente).

5 Cualquiera de los péptidos aquí descritos puede presentar una modificación en sus extremos, en el C-terminal o en el N-terminal o en ambos. Preferentemente el extremo C-terminal se puede modificar con una modificación amida, mientras que el extremo N-terminal se puede modificar por cualquier grupo protector de NH₂ adecuado, por ejemplo por acilación.

10 A este respecto, un "aminoácido modificado" puede ser cualquier aminoácido modificado, por ejemplo por glicosilación diferente en diversos organismos, por fosforilación o marcado de aminoácidos específicos. En este caso, el marcador se selecciona típicamente de entre el grupo de marcadores que incluye:

- i) marcadores radiactivos, es decir, fosforilación radiactiva o un marcador radiactivo con azufre, hidrógeno, carbono, nitrógeno, etc.;

- ii) tintes de color (por ejemplo digoxigenina, etc.);
- iii) grupos fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, etc.);
- iv) grupos quimioluminiscentes;
- 5 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 los puntos (i) a (v).

Las secuencias inhibitoras de JNK se pueden obtener o producir mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por síntesis química o métodos de ingeniería genética tal como se describe más abajo. Por ejemplo, un péptido correspondiente a una parte de una secuencia inhibitora de JNK que incluye una región deseada de dicha secuencia inhibitora de JNK, o que media en la actividad deseada *in vitro* o *in vivo*, se puede sintetizar usando un sintetizador peptídico.

La presente invención proporciona un péptido quimérico que incluye un primer dominio y un segundo dominio, consistiendo el primer dominio una secuencia de tráfico tal como se define en la reivindicación 1, mientras que el segundo dominio consiste en una secuencia inhibitora de JNK tal como se define arriba, estando unido el primer dominio al extremo C-terminal del segundo dominio tanto directamente como mediante una secuencia de unión que consiste en 1 a 10 aminoácidos.

Típicamente, los péptidos quiméricos según la presente invención tienen una longitud de al menos 25 residuos aminoácidos, por ejemplo de 25 a 250 residuos, en especial de 25 a 200 residuos, de forma especialmente preferente de 25 a 150 residuos, de 25 a 100 residuos de aminoácido y de forma totalmente preferente de 25 a 50 residuos de aminoácido.

El primer dominio del péptido quimérico de la invención consiste en una secuencia de tráfico tal como se define en la reivindicación 1, que dirige un péptido (donde dicha secuencia está presente) a un destino celular deseado. Por consiguiente, la secuencia de tráfico, tal como se utiliza aquí, dirige típicamente el péptido a través de la membrana plasmática, por ejemplo desde el exterior de la célula y a través de la membrana plasmática, hasta el interior del citoplasma. Alternativa o adicionalmente, la secuencia de tráfico puede dirigir el péptido a un lugar deseado dentro de la célula, por ejemplo al núcleo, el ribosoma, el retículo endoplásmico (RE), un lisosoma o peroxisoma, por ejemplo combinando dos componentes (por ejemplo un componente para la permeabilidad celular y un componente para la localización del núcleo) o con un único componente que tenga por ejemplo propiedades de transporte a través de la membrana celular y de transporte dirigido, por ejemplo intracelular. La secuencia de tráfico puede comprender adicionalmente otro componente capaz de unirse a un componente citoplásmico o a cualquier otro componente o compartimento celular (por ejemplo al retículo endoplásmico, mitocondria, aparato de Golgi, vesículas lisosomales). Así, por ejemplo la secuencia de tráfico del primer dominio y la secuencia inhibitora de JNK del segundo dominio se pueden localizar en el citoplasma o en cualquier otro compartimento celular. Esto permite determinar la localización del péptido quimérico en la célula después de la absorción.

De acuerdo con la presente invención, la secuencia de tráfico del péptido quimérico de la invención está compuesta exclusivamente por aminoácidos D y se corresponde con la Secuencia retro-inversa D de SEQ ID NO: 5.

La secuencia de tráfico del primer dominio del péptido quimérico de la invención se puede obtener de fuentes naturales o se puede producir utilizando técnicas de ingeniería genética o síntesis química (véase, 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).

De acuerdo con la invención, la secuencia de tráfico del péptido quimérico consiste en un péptido retro-inverso D derivado de la secuencia de aminoácidos NH₂-GRKKRRQRRR-COOH [SEQ ID NO: 5].

Así, la secuencia de tráfico del péptido quimérico de la invención consiste en la secuencia retro-inversa D NH₂-RRRQRRKRG-COOH (D-TAT) [SEQ ID N°: 6].

Típicamente, el segundo dominio del péptido quimérico de la invención consiste en una secuencia inhibitora de JNK de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

Los dos dominios, es decir, el primer y el segundo dominio del péptido quimérico de la invención, se unen de modo que formen una unidad funcional. Para unir los dominios primero y segundo se puede emplear cualquier método conocido generalmente en la técnica.

De acuerdo con una realización, el primer y el segundo dominio del péptido quimérico de la invención están unidos preferentemente mediante un enlace covalente. Un enlace covalente, tal como se define aquí, puede consistir por ejemplo en un enlace peptídico, que se puede obtener expresando la proteína quimérica de la invención como proteína de fusión. Las proteínas de fusión, tal como se describen aquí, se pueden formar y utilizar de modos análogos a las técnicas de ADN recombinante estándar o fácilmente adaptables a partir de éstas, tal como se describe más abajo. No obstante, los dos dominios también pueden estar unidos mediante cadenas laterales o por una fracción de enlace químico.

El primer y/o el segundo dominio del péptido quimérico de la invención pueden estar presentes en una o más copias en el péptido quimérico de la invención. Si ambos dominios están presentes en una sola copia, el primer dominio está unido al extremo C-terminal del segundo dominio. El segundo dominio puede estar presente en el péptido quimérico de la invención en una cantidad de varias copias, por ejemplo en dos, tres o más copias que preferentemente se disponen en orden consecutivo. Entonces, el segundo dominio puede estar presente en una copia simple en el terminal N de la secuencia que comprende el primer dominio. Alternativamente, el segundo dominio puede estar presente como varias copias, por ejemplo dos, tres o más copias, y el primer dominio puede estar presente en una sola copia.

El primer y el segundo dominio pueden estar unidos directamente entre sí sin ningún enlazante. Alternativamente, pueden estar unidos entre sí mediante una secuencia de enlace que incluye de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5 aminoácidos. Los aminoácidos que forman la secuencia de enlace se seleccionan preferentemente de entre glicina o prolina. De forma especialmente preferente, el primer y el segundo dominios pueden estar separados entre sí por una bisagra de dos, tres o más residuos de prolina entre el primer y el segundo dominio.

De acuerdo con una realización específica, el péptido quimérico de la invención consiste en péptidos quiméricos de aminoácidos D, de acuerdo con el péptido TAT-IB1 [NH₂-DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRRRQRRKRG-COOH, SEQ ID N°: 11]. No obstante, la parte enlazante del primer y segundo dominios (en lugar de PP) puede estar compuesta por una secuencia enlazante tal como se define aquí.

El primer y el segundo dominio del péptido quimérico de la invención definido anteriormente pueden estar unidos entre sí mediante acoplamiento químico o bioquímico realizado de cualquier forma adecuada conocida en la técnica, por ejemplo estableciendo un enlace peptídico entre el primer y el segundo dominio, por ejemplo expresando el primer y el segundo dominio como una proteína de fusión o por ejemplo reticulando el primer y el segundo dominio del péptido quimérico de la invención.

Muchos métodos de reticulación química conocidos no son específicos, es decir, no dirigen el punto de acoplamiento a ningún sitio particular del polipéptido de transporte o la macromolécula de carga. Por ello, el uso de agentes reticulantes no específicos puede atacar sitios funcionales o bloquear estéricamente sitios activos, inactivando biológicamente las proteínas conjugadas. Por consiguiente, preferentemente se utilizan métodos de reticulación que permiten un acoplamiento más específico del primer y el segundo dominio.

Un modo de incrementar la especificidad del acoplamiento consiste en un acoplamiento químico directo con un grupo funcional presente solo una vez o unas pocas veces en el primer o en el segundo dominio a reticular, o en ambos. Por ejemplo, la cisteína, que es el único aminoácido proteínico que contiene un grupo tiol, está presente en muchas proteínas sólo unas pocas veces. También por ejemplo, si un polipéptido no contiene ningún residuo de lisina, un reactivo de reticulación específico con respecto a aminas primarias será selectivo para el extremo amino de dicho polipéptido. La utilización con éxito de este método para aumentar la especificidad del acoplamiento requiere que el polipéptido tenga los residuos reactivos y poco frecuentes adecuados en áreas de la molécula que puedan alterarse sin que ésta pierda su actividad biológica.

Los residuos de cisteína se pueden sustituir cuando están presentes en partes de una secuencia polipeptídica en las que, de otro modo, su participación en una reacción de reticulación probablemente interferiría en la actividad biológica. Cuando se sustituye un residuo cisteína, en general es deseable reducir al mínimo los cambios resultantes en el plegamiento del polipéptido. Los cambios en el plegado del polipéptido se reducen al mínimo cuando el sustitutivo es química y estéricamente similar a la cisteína. Por estas razones es preferible utilizar serina como sustituto de la cisteína. Tal como se demuestra en los ejemplos más abajo, en una secuencia de aminoácidos polipeptídica se puede introducir un residuo cisteína para la reticulación.

Cuando se introduce un residuo cisteína, es preferible su inserción en el extremo amino o carboxi o cerca del mismo. Son conocidos métodos convencionales para estas modificaciones de las secuencias de aminoácidos en los que el polipéptido de interés se produce mediante síntesis química o a través de la expresión de ADN recombinante.

El acoplamiento del primer y segundo dominios también se puede llevar a cabo a través de un agente de acoplamiento o conjugación. Se pueden emplear diversos reactivos de reticulación intermolecular (véase, por ejemplo, Means y Feeney, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 1974, pp. 39-43). Entre estos reactivos se encuentran, por ejemplo, 3-(2-piridil)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-
 5 fenilen)-bismaleimida (ambos altamente específicos con respecto a los grupos sulfhidrilo, forman enlaces irreversibles); N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otros reactivos de este tipo con 6 a 11 puentes de carbono metilénicos (que son relativamente específicos con respecto a los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con los grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación útiles para este fin incluyen: p,p'-difluor-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma reticulaciones
 10 irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico con respecto a los grupos amino); fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con grupos amino); diisocianato o diisotiocianato de hexametileno o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con diversas cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

15 Los reactivos de reticulación pueden ser homobifuncionales, esto es con dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferente es bismaleimidohexano ("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 consiguiente, el BMH es útil para la
 20 reticulación irreversible de polipéptidos que contienen residuos cisteína.

Los reactivos de reticulación también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo reactivo frente a amina y otros a tiol, que reticularán dos proteínas que tengan aminas y tioles libres, respectivamente.

25 Como ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales se mencionan: 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo ("SMCC"), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida ("MBS") y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida ("SMPB"), un análogo de MBS de cadena prolongada. El grupo succinimidilo de estos reticulantes reacciona con una amina primaria y la maleimida reactiva frente a tiol forma un enlace covalente con el tiol de un residuo cisteína.

30 Con frecuencia, los reactivos de reticulación son poco solubles en agua. Para mejorar la solubilidad en agua del reactivo de reticulación se le puede añadir una fracción hidrófila, por ejemplo un grupo sulfonato. A este respecto, el sulfo-MBS y el sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados para aumentar su solubilidad en agua que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención.

35 Muchos reactivos reticulantes producen un conjugado que esencialmente no es segmentable bajo condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de reticulación contienen un enlace covalente, tal como disulfuro, que es segmentable bajo condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) ("DPS") y 3-(2-piridil)propionato de N-succinimidilo ("SPDP") son reticulantes segmentables bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación segmentable permite que la fracción de carga se separe del polipéptido de transporte después de su suministro al interior de la célula diana. También puede resultar útil un enlace directo disulfuro.

40 Numerosos reactivos de reticulación, incluyendo los arriba descritos, son comerciales. Las instrucciones detalladas para su uso se pueden obtener fácilmente de los proveedores comerciales. Una referencia general de la reticulación de proteínas y la preparación de conjugados es: Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press (1991).

45 La reticulación química puede incluir el uso de brazos separadores. Los brazos separadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre fracciones conjugadas, ayudando así a conservar la actividad biológica. Un brazo separador puede tener la forma de una fracción polipeptídica que incluye aminoácidos separadores, por ejemplo prolina. Alternativamente, un brazo separador puede formar parte del reactivo de reticulación, por ejemplo en un "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, IL., cat. No. 21651 H).

50 Los péptidos quiméricos se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a dichos compuestos peptídicos. Estos anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab policlonales, monoclonales, quiméricos de cadena simple y una librería de expresión de Fab. Para producir estos anticuerpos se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica.

55 A modo de ejemplo, se pueden inmunizar diversos animales huésped para producir anticuerpos policlonales mediante inyección con un péptido quimérico de la invención tal como se ha definido arriba. Para ello se

5 pueden emplear diversos a adyuvante con el fin de incrementar la respuesta inmunológica, incluyendo, sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo hidróxido de aluminio), surfactantes (por ejemplo liolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenol, etc.), CpG, polímeros, Pluronic, y adyuvantes humanos tales como Bacilo Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*.

10 Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un péptido quimérico de la invención como se ha definido arriba, se puede emplear cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas. Tales técnicas incluyen, sin limitación, técnicas de hibridoma (ver Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256: 495-497); técnica del trioma; técnica de hibridoma de células humanas B (ver Kozbor, y col., 1983, *Immunol Today* 4: 72) y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (ver Cole, y col., 1985. En: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden emplearse y producirse mediante el uso de hibridomas humanos (ver Cote, y col., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con el virus de Epstein Barr *in vitro* (ver Cole, y col., 1985. En: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

20 Las técnicas se pueden adaptar para la producción de anticuerpos simples específicos de los péptidos quiméricos de la invención (ver por ejemplo la patente US 4.946.778). Además, los métodos se pueden adaptar para la construcción de librerías de expresión de Fab (ver por ejemplo Huse y col., 1989. *Science* 246: 1275-1281) para facilitar la identificación rápida y efectiva de fragmentos monoclonales Fab con la especificidad deseada para estos péptidos quiméricos de la invención arriba definidos. Los anticuerpos no-humanos se pueden "humanizar" mediante técnicas bien conocidas en el campo (ver por ejemplo la patente US 5.225.539). Se pueden producir fragmentos de anticuerpos que contienen los ideotipos de secuencias inhibitoras de JNK y/o del péptido quimérico de la invención, por ejemplo (i) un fragmento F(ab')₂ obtenido por digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado por reducción de puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor y (iv) fragmentos Fv.

30 Métodos para el cribado de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, sin limitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas inmunológicamente-mediadas conocidas en la técnica. La selección de anticuerpos que son específicos de un epítipo particular de un péptido quimérico de la invención (por ejemplo un fragmento del mismo con una longitud típica de 5 a 20, preferentemente de 8 a 18 y en particular de 8 a 11 aminoácidos) es facilitada por la generación de hibridomas que se unen al fragmento de un péptido quimérico de la invención que posee tal epítipo.

35 Los anticuerpos pueden emplearse en métodos conocidos en la técnica relativos a la localización y/o cuantificación de un péptido quimérico de la invención, por ejemplo para su uso en la medida de los niveles del péptido dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en métodos diagnósticos o para su uso en métodos de visualización del péptido, y similares.

40 Los péptidos quiméricos de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas, también incluidas aquí. Estas composiciones pueden comprender, además de una de dichas sustancias, excipientes, vehículos, tampones o estabilizantes farmacéuticamente aceptables u otros materiales conocidos por los especialistas. Estos materiales no deben ser tóxicos ni interferir en la eficacia del principio activo. La naturaleza concreta del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal o por parches.

45 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden presentar en forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. En general, las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, un aceite mineral o sintético. También pueden incluir una solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

50 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o en local en la dolencia, el ingrediente activo se presentará en forma de solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las personas con conocimientos técnicos pueden preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactato. También se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Independientemente de que se trate de un polipéptido, péptido o molécula de ácido nucleico u otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención que deba ser administrado a un individuo, la administración se lleva a cabo preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea aplicable), siendo

ésta suficiente para beneficiar al individuo. La cantidad exacta administrada y la velocidad y la evolución temporal de la administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad tratada.

5 En general, la prescripción de un tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., es responsabilidad del médico y de otros clínicos, debiendo tenerse en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el lugar de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. En REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16 edición, Osol, A. (ed.) 1980, se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos arriba mencionados.

10 Alternativamente, se pueden utilizar terapias dirigidas para suministrar los péptidos quiméricos de la invención de forma más específica a determinados tipos de célula, mediante el uso de sistemas dirigidos, tales como anticuerpos (dirigidos) o ligandos celulares específicos. Los anticuerpos utilizados para la dirección son típicamente específicos con respecto a proteínas de la superficie celular de células asociadas a cualquiera de las enfermedades arriba definidas. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden estar dirigidos a anticuerpos de la superficie celular, por ejemplo proteínas superficiales asociadas a células B, tales como proteína DR MHC de clase II, CD18 (LFA-1 cadena beta), CD45RO, CD40 o Bgp95, o proteínas de la superficie celular seleccionadas por ejemplo entre CD2, CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD13, 15 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 se pueden preparar típicamente mediante unión covalente de los péptidos quiméricos de la invención con un anticuerpo específico con respecto a una proteína de la superficie celular o por unión a un ligando celular específico. Las proteínas se 20 pueden unir a un anticuerpo de este tipo o se pueden fijar al mismo mediante un enlace peptídico o mediante acoplamiento químico, reticulación, etc. La terapia diana se puede llevar a cabo administrando a un paciente el constructo diana en una cantidad farmacéuticamente eficaz a través de cualquiera de las vías de administración definidas más abajo, por ejemplo, vía de administración intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral y en parche. Preferentemente, los péptidos quiméricos de la invención unidos a los anticuerpos dirigidos o a ligandos celulares específicos tal como se definen más arriba se pueden liberar *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo por hidrólisis del enlace covalente, mediante peptidasas o mediante cualquier otro método adecuado. Alternativamente, si los péptidos quiméricos de la invención están unidos a un ligando celular específico de células pequeñas, la liberación del ligando puede no llevarse a cabo. Si están presentes en la superficie celular, los péptidos quiméricos de la invención pueden entrar en la célula por la actividad de su secuencia de 25 tráfico. La dirección puede ser deseable por diversas razones, por ejemplo cuando las secuencias inhibitoras de JNK de la invención y los péptidos quiméricos de la invención son inaceptablemente tóxicos o si, en otro caso, se requiriese una dosis demasiado alta.

30 Los péptidos quiméricos de la invención se podrían administrar en una forma precursora mediante el uso de un anticuerpo o un virus. Entonces, los péptidos quiméricos de la invención se pueden convertir en la forma activa mediante un agente de activación producido en las células a tratar o dirigido a las mismas. Este tipo de enfoque se conoce a veces como ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy* - terapia con profármaco enzimático dirigido a anticuerpos). El ADEPT implica dirigir el agente activador a las células mediante conjugación con un anticuerpo específico celular.

35 La presente invención también incluye el uso de péptidos quiméricos de la invención para preparar una composición farmacéutica, por ejemplo tal como se describe más arriba, para prevenir y/o tratar trastornos de la proliferación celular asociados a la activación de JNK en un sujeto ("trastornos asociados con JNK"). En general, una composición farmacéutica de este tipo de acuerdo con la presente invención incluye como componente activo por ejemplo: (i) cualquiera o cualesquiera de los péptidos quiméricos de la invención.

40 La prevención y/o el tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye típicamente la administración de una composición farmacéutica de la invención tal como se define más arriba. El término "modular" incluye la supresión de la expresión de JNK en caso de sobreexpresión de la misma. También incluye la supresión o fosforilación de c-jun, ATF2 o NFAT4, por ejemplo, empleando un péptido de cualquiera o cualesquiera de las SEQ ID N°: 1-4 y/o 9-12 como inhibidor competitivo del sitio de unión natural de c-jun, ATF2 y NFAT4 en una célula. El término "modular" también incluye la supresión de complejos heteroméricos y homoméricos de 45 factores de transcripción formados por c-jun, ATF2 o NFAT4 y sus compañeros relacionados, por ejemplo el complejo AP-1, que está formado por c-jun, ATF2 y c-fos. Cuando un trastorno de proliferación celular está asociado a una sobreexpresión de JNK, dichas secuencias inhibitoras de JNK supresoras se pueden introducir en una célula. En algunos casos, "modular" puede incluir el aumento de la expresión de JNK, por ejemplo mediante el uso de un anticuerpo específico del péptido IB que bloquea la unión de un péptido IB con 50 JNK, evitando así la inhibición de JNK mediante el péptido relacionado con IB.

55 La prevención y/o el tratamiento de un sujeto con la composición farmacéutica de la invención tal como se describe más arriba se puede llevar a cabo típicamente administrando (*in vivo*) una cantidad ("terapéuticamente eficaz") de dicha composición farmacéutica a un sujeto, pudiendo ser este sujeto por

ejemplo cualquier mamífero, por ejemplo humano, primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo o cerdo. El concepto “terapéuticamente eficaz” significa que la cantidad del componente activo de la composición farmacéutica es suficiente para mejorar el trastorno asociado a la JNK.

- 5 Los conceptos “trastorno de proliferación celular” o “trastorno asociado con JNK” tal como se utilizan más arriba indican poblaciones celulares malignas y no malignas *in vivo* e *in vitro* que, con frecuencia, parecen ser diferentes morfológica y funcionalmente al tejido circundante y que se caracterizan típicamente por niveles aberrantes de JNK. Un “nivel aberrante de JNK” significa un nivel elevado o reducido de JNK en una parte del sujeto a tratar en comparación con el nivel presente en una parte análoga no afectada de un sujeto que no padece el trastorno.
- 10 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles para prevenir y/o tratar tumores malignos de los diversos sistemas de órganos en los que se ha venido demostrando la activación de JNK, por ejemplo de pulmón, de mama, linfoide, del tracto gastrointestinal y genitourinario y también adenocarcinomas, incluyendo tumores malignos como la mayor parte de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y
- 15 cáncer de esófago. También están incluidos leucemia, trastornos o fisiopatologías asociados a la transformación oncogénica, así como cánceres con transformaciones oncogénicas Bcr-Abl que claramente requieren la activación de JNK.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden utilizar para prevenir y/o tratar trastornos de la proliferación celular no malignos o relacionados con la inmunología, tales como psoriasis, pénfigo vulgar, síndrome de Behcet, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SDRA), enfermedad cardíaca isquémica, síndrome posdiálisis, artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, vasculitis, *shock* séptico y otros tipos de inflamación aguda, e histiocitosis lipídica. Los trastornos inmunopatológicos son especialmente preferentes. Esencialmente cualquier trastorno relacionado etiológicamente con la actividad de la quinasa JNK se considera susceptible de prevención o tratamiento,
- 20 por ejemplo trastornos o fisiopatologías asociados a la activación de JNK en una o más células tal como se define más arriba, por ejemplo restenosis, pérdida de audición, traumas del oído, isquemia, apoplejía y/o trastornos o fisiopatologías asociados con la maduración y diferenciación de inmunocitos, lesiones de reperfusión, hipoxia, enfermedades relacionadas con la apoptosis (por ejemplo en caso de infecciones virales (por ejemplo SIDA), enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo apoplejía,
- 30 traumatismo encefálico, lesiones de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson), enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y envejecimiento), respuesta a estímulos estresantes y con efectos secundarios debidos a tratamientos, por ejemplo con citoquinas proinflamatorias. La composición farmacéutica de la invención también se puede utilizar para tratar o prevenir los efectos asociados a la diabetes o al esfuerzo de
- 35 cizalladura celular, por ejemplo en estados patológicos inducidos por hipertensión arterial, incluyendo hipertrofia del corazón y cardíaca y lesiones arterioscleróticas, y en bifurcaciones de vasos sanguíneos, y similares, mediante radiación ionizante tal como se utiliza en la radioterapia y luz ultravioleta (luz UV), mediante radicales libres, agentes perjudiciales para el ADN, incluyendo fármacos quimioterapéuticos, por lesiones de isquemia/reperfusión, por hipoxia, y/o hipotermia e hipertermia. Por último, en el contexto de las
- 40 enfermedades, trastornos o fisiopatologías arriba mencionadas, la composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para inhibir la expresión de genes cuya expresión aumenta en presencia de un polipéptido de JNK activo. Generalmente, estos genes y productos genéticos incluyen por ejemplo citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas se encuentran en todas las formas de enfermedades inflamatorias, autoinflamatorias, inmunes y autoinmunes, enfermedades degenerativas, miopatías, cardiomiopatías y
- 45 rechazo de injertos.

Los péptidos quiméricos de la invención se pueden utilizar en cualquier situación donde se desee una inhibición de la actividad de JNK, dado que las JNK y todas sus isoformas participan en el desarrollo y establecimiento de estados patológicos o en vías de los mismos. Este uso puede incluir administraciones *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

- 50 De acuerdo con otra realización, los péptidos quiméricos de la invención se pueden utilizar en ensayos (*in vitro*) (por ejemplo inmunoensayos) para detectar, pronosticar, diagnosticar o controlar diversas afecciones, enfermedades y/o trastornos tal como se definen más arriba, o para controlar el tratamiento de los mismos. El inmunoensayo se puede llevar a cabo mediante un método que consiste en poner en contacto una muestra procedente de un paciente con un anticuerpo para un péptido quimérico de la invención, bajo condiciones de
- 55 unión inmuno-específica, y a continuación detectar o medir la cantidad de la eventual unión inmuno-específica por el anticuerpo. En una realización específica se puede utilizar un anticuerpo específico con respecto a un péptido quimérico de la invención para analizar un tejido o una muestra de suero de un paciente en cuanto a la presencia de JNK o una secuencia inhibidora de JNK. En este caso, un nivel aberrante de JNK es indicativo de una enfermedad. Los inmunoensayos a utilizar incluyen, de forma no exclusiva, sistemas de

ensayo competitivo y no competitivo empleando técnicas tales como *Western Blot*, radioinmunoensayo (RIA), ensayo con sustancias inmuoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), inmunoensayos en “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, ensayos de fijación de
 5 complemento, ensayos inmunorradiométricos e inmunoensayos de proteína A, etc. Alternativamente se pueden realizar ensayos (*in vitro*) mediante el suministro de los péptidos quiméricos de la invención a células diana seleccionadas típicamente por ejemplo entre células animales cultivadas, células humanas o microorganismos, y controlar la respuesta celular por métodos biofísicos bien conocidos por los especialistas. Las células diana utilizadas típicamente pueden consistir en células cultivadas (*in vitro*) o células *in vivo*, es
 10 decir, células que componen los órganos o tejidos de animales o humanos vivos, o microorganismos que se encuentran en animales o humanos vivos.

La presente invención proporciona adicionalmente *kits* para fines diagnósticos o terapéuticos que incluyen uno o más recipientes que péptidos quiméricos de la invención, y opcionalmente un compañero de unión
 15 marcado para el anticuerpo. El marcador así incorporado al anticuerpo puede incluir, de forma no exclusiva, una fracción quimioluminiscente, enzimática, fluorescente, colorimétrica o radiactiva. En otra realización específica, se proporcionan *kits* para uso diagnóstico que comprenden uno o más recipientes que contienen ácidos nucleicos que codifican péptidos quiméricos de la invención, o alternativamente que son complementarios a éstos. Opcionalmente, el *kit* también puede incluir una cantidad determinada de un péptido quimérico de la invención para su uso como diagnóstico, patrón o control en los ensayos.

20 El alcance de la presente invención no se limita a las realizaciones específicas aquí descritas. De hecho, a partir de la anterior descripción y las figuras adjuntas, para los expertos en la técnica serán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las aquí descritas.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el
 25 significado entendido habitualmente por el experto medio en la técnica a la que pertenece esta invención. Más abajo se describen métodos y materiales adecuados, aunque en la práctica o la prueba de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. En caso de conflicto prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no establecen ninguna limitación. Otras características y ventajas de la invención se desprenden claramente de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

30 Descripción de las figuras

FIG. 1A-C Diagramas que muestran alineaciones de regiones de dominio JBD conservadas en los factores de transcripción indicados. Las secuencias inhibitoras de JNK se identificaron inspeccionando estas alineaciones de secuencias. Las Fig. 1A-C muestran los
 35 resultados de esta alineación a modo de ejemplo. La FIG. 1A representa la región de mayor homología entre los JBD de IB1, IB2, c-Jun y ATF2. El Panel B representa la secuencia de aminoácidos de los JBD de L-IB1(s) y L-IB1 con fines comparativos. Los residuos completamente conservados se indican con asteriscos, mientras que los residuos cambiados a Ala en el vector GFP-JBD_{23Mut} se indican con círculos abiertos. La FIG. 1C muestra las secuencias de aminoácidos de proteínas quiméricas que incluyen una secuencia inhibitora de JNK y una secuencia de tráfico. En el ejemplo
 40 mostrado, la secuencia de tráfico se deriva del polipéptido TAT del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y la secuencia inhibitora de JNK se deriva de un polipéptido IB1(s). Las secuencias humano, ratón y rata son idénticas en los Paneles B y C.

45 FIG. 2 Esquema que muestra las secuencias de los péptidos de fusión TAT-IB genéricos de humano, ratón y rata.

FIG. 3 Resultados de evaluar la neuroprotección contra la isquemia cerebral focal en un modelo MCAO permanente. La eficacia de la protección se determinó a diferentes dosis (véase la Fig. 3). Como se observa en la Fig. 3, al menos las dosis de 11 mg/kg, 50 3 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,03 mg/kg contribuyen a una protección cerebral. La mejor protección se observa en caso de una dosis de 0,03 mg/kg.

FIG. 4 Evaluación de la neuroprotección por un péptido quimérico de la invención de SEQ ID N°: 11 después de administración i.v. contra la isquemia cerebral focal en un modelo MCAO transitorio. Después de provocar una isquemia en ratones adultos, los ratones
 55 fueron sacrificados 48 horas después de la reperusión. Como se observa en la Fig. 4, el péptido quimérico de la invención proporciona una neuroprotección eficaz.

- FIG. 5 Resultados de un ensayo de cultivo neuronal midiendo la liberación de LDH después de estimulación con NMDA. Los resultados indican claramente un efecto neuroprotector del péptido D-JNK11 quimérico de la invención (SEQ ID N°: 11), dado que los cambios degenerativos debido a la exposición a NMDA se inhibieron por completo como indica la ausencia de una liberación de LDH significativa por encima de los controles.
- FIG. 6 Resultados de la inhibición de la actividad de JNK endógena en células HepG2 utilizando péptidos de fusión de la invención de acuerdo con las SEQ ID N°: 9 y 11 en un método de pocillo. Como se observa en la Fig. 6, en particular en el panel de la Fig. 6, el D-TAT-IB1 (s) de SEQ ID N°: 11 (aquí abreviado como D-JNKI) inhibe efectivamente la actividad de JNK, incluso mejor que L-TAT-IB1(s) de SEQ ID N°: 9 (aquí abreviado como L-JNKI).
- FIG. 7 Efecto protector de la protección por D-TAT-IB1(s) contra la pérdida permanente de audición. Cambios en el nivel del umbral auditivo (nivel de presión acústica dB) en cobayas después de trauma por ruido (120 dB a 6 kHz durante 30 minutos) a 8 kHz, la frecuencia de impacto máximo, medidos 20 minutos (cambio temporal del umbral, TTS, gris) y 15 días después de la exposición al ruido (cambio permanente del umbral). Los cobayas recibieron D-TAT-IB1(s) en un gel de ácido hialurónico depositado sobre la membrana de la ventana redonda coclear 30 minutos antes, 30 minutos después o 4 horas después del trauma por ruido. Como control se utilizaron oídos no tratados. El TTS se midió 20 minutos después del trauma por ruido, mientras que la PTS (negro), que corresponde a la pérdida permanente de audición, se determinó 15 días después. Como se puede observar, el D-TAT-IB1(s) no sólo proporciona una protección sustancial contra la pérdida permanente de audición por trauma por ruido si se administra de forma preventiva antes de la exposición al ruido, sino también de forma dependiente del tiempo si se administra después del trauma. La PTS en oídos tratados era considerablemente menor en el caso de la administración de D-TAT-IB1(s) 30 minutos y 4 horas después del trauma que en el caso de los oídos de control no tratados.

30 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de las secuencias inhibitoras de JNK

Se identificaron secuencias de aminoácidos importantes para una interacción eficaz con JNK mediante alineaciones de secuencias entre JBD conocidos. Una comparación de secuencias entre los JBD de IB1 [SEQ ID N°: 13], IB2 [SEQ ID N°: 14], c-Jun [SEQ ID N°: 15] y ATF2 [SEQ ID N°: 16] definió una secuencia de 8 aminoácidos débilmente conservada (FIG. 1A). Dado que los JBD de IB1 e IB2 son aproximadamente 100 veces más eficaces que c-Jun o ATF2 para unirse a JNK (Dickens y col., Science 277: 693 (1997)), se razonó que los residuos conservados entre IB1 e IB2 deben ser importantes para conferir una unión máxima. La comparación entre los JBD de IB1 e IB2 definió dos bloques de siete y tres aminoácidos altamente conservados entre las dos secuencias.

Estos dos bloques están incluidos dentro de una secuencia peptídica de 19 aminoácidos en L-IB1 [SEQ ID N°: 1] y también se muestran por razones comparativas en una secuencia pepetídica de 23 aa derivada de IB1 [SEQ ID N°: 17]. Estas secuencias se muestran en la FIG. 1B, las rayas en la secuencia L-IB1 indican un hueco en la secuencia para alinear los residuos conservados con L-IB1(s).

Ejemplo 2: Preparación de proteínas de fusión inhibitoras de JNK

Se sintetizaron proteínas de fusión inhibitoras de JNK de acuerdo con SEQ ID N°: 9 mediante enlace covalente del extremo C-terminal de la SEQ ID N°: 1 con un péptido portador N-terminal de 10 aminoácidos de longitud derivado de VIH-TAT4g 57 (Vives y col., Biol. Chem. 272: 16010 (1997)) de acuerdo con SEQ ID N°: 5 a través de un enlazante consistente en dos residuos prolina. Este enlazante se utilizó para posibilitar una flexibilidad máxima y prevenir cambios estructurales secundarios no deseados. También se prepararon los constructos básicos, que se designaron L-IB1(s) (SEQ ID N°: 1) y L-TAT [SEQ ID N°: 5], respectivamente. Correspondientemente se sintetizaron los péptidos retro-inversos totalmente D de SEQ ID N°: 11. También se prepararon los constructos básicos, que se designaron D-IB1(s) [SEQ ID N°: 2] y D-TAT [SEQ ID N°: 6], respectivamente.

Se produjeron todos los péptidos de fusión de acuerdo con las SEQ ID N°: 9, 10, 11 y 12 mediante síntesis Fmock clásica y además se analizaron mediante espectrometría de masas. Finalmente se purificaron por

HPLC. Para determinar los efectos del enlace de prolina se produjeron dos tipos de péptidos TAT, uno con dos prolinas y otro sin ellas. La adición de las dos prolinas no parecía modificar la entrada o la localización del péptido TAT dentro de las células. La FIG. 2 muestra péptidos genéricos que presentan los residuos de aminoácidos conservados.

5 Ejemplo 3: Inhibición de la muerte celular por JBD19

Se estudiaron los efectos de la secuencia de JBD de IB1(s) de 19 aa de longitud sobre la actividad biológica de JNK. La secuencia de 19 aa se unió por el extremo N-terminal a la Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*) (constructo GFP JBP19), evaluándose el efecto de este constructo en la apoptosis de células β pancreáticas inducida por IL1. Previamente se había comprobado que este modo de apoptosis se bloqueaba mediante transfección con J8D₁₋₂₈₀, mientras que los inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 no proporcionaban protección (véase Ammendrup y col., *supra*).

Se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes a JBD19 que comprendían una secuencia conservada de 19 aminoácidos así como una secuencia mutada en las regiones completamente conservadas, y se insertaron direccionalmente en los sitios EcoRI y Sall del vector pEGFP-N1 que codifica la Proteína Verde Fluorescente (GFP - *Green Fluorescent Protein*) (de Clontech). Se cultivaron células β TC-3 productoras de insulina en medio RPMI 1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal, 100 μ g/ml de estreptomycin, 100 unidades/ml de penicilina y glutamina 2 mM. Las células β TC-3 productoras de insulina se sometieron a transfección con los vectores indicados y se añadió IL-1 β (10 ng/ml) al medio de cultivo celular. Cuarenta y ocho horas después de la adición de IL-1 β se contó el número de células apoptóticas utilizando un microscopio de fluorescencia invertido. Las células apoptóticas se distinguieron de las células normales por la "vacuolización" característica del citoplasma y se contaron después de dos días.

GFP es el vector de expresión de Proteína Verde Fluorescente utilizado como control; JBD19 es el vector que expresa una GFP quimérica unida a la secuencia de 19 aa derivada del JBD de IB1; JBD19Mut es el mismo vector que GFP-JBD19, pero con un JBD mutado en cuatro residuos conservados tal como muestra la FIG. 1B; y JBD₁₋₂₈₀ es el vector GFP unido a la JBD completa (aa 1-280). El constructo de expresión GFP-JBD19 prevenía la apoptosis de células β pancreáticas β inducida por IL-1 con la misma eficiencia que el JBD₁₋₂₈₀ completo. Como controles adicionales, las secuencias mutadas en residuos IB1(s) completamente conservados tenían una capacidad muy reducida para prevenir la apoptosis.

Ejemplo 4: Importación celular de péptidos TAT-IB1 (s)

Se evaluó la capacidad de las formas enantioméricas L y D de los péptidos TAT y TAT-IB1 ("péptidos TAT-IB") de la invención para entrar en las células. Los péptidos L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1(s) de la invención y D-TAT-IB1(s) de la invención [SEQ ID N^o: 5, 6, 9 y 12, respectivamente] se marcaron mediante adición N-terminal de un residuo de glicina conjugado con fluoresceína. Los péptidos marcados (1 μ M) se añadieron a cultivos de células β TC-3, que se mantuvieron tal como se describe en el Ejemplo 3. En momentos determinados, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante cinco minutos en metanol:acetona (1:1) sumamente frío antes de examinarlas bajo microscopio de fluorescencia. Como control se utilizó BSA marcada con fluoresceína (1 μ M, 12 mol/mol de BSA). Los resultados demostraron que todos los péptidos marcados con fluoresceína arriba indicados habían entrado eficaz y rápidamente (menos de cinco minutos) en las células una vez añadidos al medio de cultivo. En cambio, la seroalbúmina bovina marcada con fluoresceína (BSA 1 μ M, 12 moles de fluoresceína/mol de BSA) no entró en las células.

Un estudio de la evolución temporal demostró que la intensidad de la señal fluorescente en el caso de los péptidos enantioméricos L disminuía en un 70% después de un período de 24 horas. Después de 48 horas apenas había señal o no había señal en absoluto. En cambio, los péptidos D-TAT y D-TAT-IB1(s) de la invención eran extremadamente estables dentro de las células.

Las señales fluorescentes de estos péptidos retro-inverso totalmente D seguían siendo muy fuertes una semana después, y la señal solo había disminuido ligeramente 2 semanas después del tratamiento.

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

Los efectos de los péptidos en la fosforilación mediada por JNK de sus factores de transcripción diana se investigaron *in vitro*. Se produjeron JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes y no activadas utilizando un *kit* de lisado de reticulocitos de conejo de TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN (Promega), y se utilizaron en ensayos de quinasa en fase sólida con c-Jun, ATF2 y Elk1, solos o fusionados con glutatión-S-transferasa (GST), como sustrato. Se llevaron a cabo estudios dosis-respuesta donde se mezclaron los péptidos L-TAT o L-TAT-IB1(s) de la invención (0-25 μ M) con las quinasas JNK1, JNK2 o JNK3 recombinantes en un tampón de reacción (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, p-nitrofenil-fosfato (pNPP) 10 mM, pirofosfato de sodio 5 mM,

p-glicerofosfato 10 mM, ditioneitol 1 mM) durante 20 minutos. Las reacciones de quinasa se iniciaron por adición de MgCl₂ 10 mM y 5 pCi 33P- γ -dATP y 1 μ g de GST-Jun (aa 1-89), GST-AFT2 (aa 1-96) o GST-ELK1 (aa 307-428). Las proteínas de fusión de GST se compraron en Stratagene (La Jolla, CA).

- 5 También se añadieron a la mezcla 10 μ l de perlas de glutatión-agarosa. Después, los productos de reacción se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturizante. El gel se secó y a continuación se expuso a películas de rayos X (Kodak). Con dosis del péptido TAT-IB(s) de la invención de sólo 2,5 μ M ya se observó una inhibición prácticamente completa de la fosforilación de c-Jun, ATF2 y Elk1 por JNK. Sin embargo, una excepción notable fue la ausencia de inhibición por TAT-IB(s) de la fosforilación de Elk1 por JNK3.
- 10 En conjunto, el péptido TAT-IB1(s) demostró efectos superiores en la inhibición de la fosforilación por la familia JNK de sus factores de transcripción diana. La capacidad de los péptidos D-TAT, D-TAT-IB1(s) de la invención y L-TAT-IB1(s) de la invención (estudio con dosis de 0-250 μ M) para inhibir la fosforilación de GST-Jun (aa 1-73) por JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes se analizaron tal como se describe más arriba. En conjunto, el péptido D-TAT-IB1(s) disminuyó la fosforilación de c-jun mediada por JNK, pero en niveles
- 15 aproximadamente 10-20 veces menos eficaces que el L-TAT-IB1(s).

Ejemplo 6: Inhibición de la fosforilación de c-JUN por JNK activadas

- Los efectos de los péptidos L-TAT o L-TAT-IB1(s) en JNK activadas por estímulos estresantes se evaluaron utilizando GST-Jun para empujar los JNK de células HeLa irradiadas con luz UV o células PTC tratadas con IL-1 β . Las células PTC se cultivaron tal como se describe más arriba. Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM complementados con suero bovino fetal al 10%, 100 μ g/ml de estreptomycin, 100 unidades/ml de penicilina y glutamina 2 mM. Una hora antes de utilizarlas para preparar el extracto celular, las células PCT se activaron con IL-1 β tal como se describe más arriba, mientras que las células HeLa se activaron con luz UV (20 J/m²). Los extractos celulares se prepararon a partir de control, células HeLa irradiadas con luz UV y células β TC-3 tratadas con IL-1 β raspando los cultivos celulares en tampón de lisis (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, 1% Triton X-100, p-nitrofenil-fosfato 10 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, glicerofosfato 10 mM, ditioneitol 1 mM). Los desechos se retiraron por centrifugación durante cinco minutos a 15.000 rpm en un rotor SS-34 Beckman. Se incubaron extractos de 100 μ g durante una hora a temperatura ambiente con 1 μ g de GST-jun (aminoácidos 1-89) y 10 μ l de perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Después de cuatro lavados con el tampón de raspado, las perlas se resuspendieron en el mismo tampón complementado con péptidos L-TAT o L-TAT-IB1(s) de la invención (25 μ M) durante 20 minutos. Después se iniciaron las reacciones de la quinasa por adición de MgCl₂ 10 mM y 5 pCi³³P- γ -dATP, y se incubaron durante 30 minutos a 30°C.
- 20
- 25
- 30

Entonces se separaron los productos de reacción mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturizante. Los geles se secaron y a continuación se expusieron a películas de rayos X (Kodak). En estos experimentos, los péptidos TAT-1B(s) previnieron eficientemente la fosforilación de c-Jun por JNK activadas.

35

Ejemplo 7: Inhibición *in vivo* de la fosforilación de c-JUN por los péptidos TAT-IB(s)

- Para determinar si los péptidos con permeabilidad celular podían bloquear las señales de JNK *in vivo*, se utilizó un sistema GAL4 heterólogo. Células HeLa cultivadas como se describe más arriba se sometieron a cotransfección con el vector indicador 5XGAL-LUC junto con el constructo de expresión GAL-Jun (Stratagene) que incluía el dominio de activación de c-Jun (aminoácidos 1-89) enlazado al dominio de unión de ADN GAL4. La activación de la JNK se logró mediante la cotransfección de vectores que expresaban las quinasas situadas directamente aguas arriba de MKK4 y MKK7 (véase Whitmarsh y col., Science 285: 1573 (1999)). En pocas palabras, 3·10⁵ células se sometieron a transfección con los plásmidos en placas de 3,5 cm utilizando DOTAP (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los experimentos que implicaban GAL-Jun, 20 ng del plásmido se sometieron a transfección con 1 μ g del plásmido indicador pFR-Luc (Stratagene) y 0,5 μ g de plásmidos de expresión de MKK4 o MKK7. Tres horas después de la transfección, los medios celulares se cambiaron y se añadieron péptidos TAT y TAT-IB1(s) (1 μ M). Dieciséis horas más tarde se midió la actividad de luciferasa utilizando el "Dual Reportes System" de Promega después de normalización al contenido proteínico. La adición de péptido TAT-IB1(s) bloqueaba la activación de c-Jun después de la activación de JNK mediada por MKK4 y MKK7. Dado que las células HeLa expresan las isoformas JNK1 y JNK2, pero no la isoforma JNK3, algunas células se sometieron a transfección con JNK3. De nuevo, el péptido TAT-IB1(s) inhibía la activación de c-Jun mediada por JNK2.
- 40
- 45
- 50

Ejemplo 8: Inhibición de la muerte de células β pancreáticas inducida por IL-1 β mediante péptidos TAT-IB

Se investigaron los efectos de los péptidos L-TAT-IB(s) en la promoción de la apoptosis de células β provocada por IL-1. Se incubaron cultivos de células β TC-3 durante 30 minutos con 1 μ M del L-TAT-IB1 (s) de la invención seguido de 10 ng/ml de IL-1. Veinticuatro horas después se realizó una segunda adición de péptido (1 μ M). Las células apoptóticas se contaron después de dos días de incubación con IL-1 β utilizando yoduro de propidio (las células teñidas de rojo son células muertas) y tinción nuclear Hoechst 33342 (las células teñidas de azul son células con la membrana plasmática intacta). La adición de péptidos TAT-IB(s) inhibía la apoptosis inducida por IL-1 de células β TC-3 cultivadas en presencia de IL-1 β durante dos días.

La inhibición a largo plazo de la muerte celular inducida por IL-1 se examinó tratando células β TC-3 tal como se describe más arriba, excepto que la incubación de las células con los péptidos e IL-1 β se mantuvo durante 12 días. Cada día se añadieron péptidos adicionales (1 μ M) y cada 2 días se añadió IL-1 β adicional (10 ng/ml). El péptido TAT-IB1(s) de la invención confiere una fuerte protección contra la apoptosis en estas condiciones. En conjunto, estos experimentos demuestran que los péptidos TAT-IB(s) son moléculas biológicamente activas capaces de prevenir los efectos de las señales de JNK en el destino de las células.

Ejemplo 9: Síntesis de los péptidos IB(s) retro-inversos totalmente D de la invención

Los péptidos de la invención pueden ser péptidos de aminoácidos totalmente D sintetizados en inverso para prevenir la proteólisis natural (es decir, péptidos retro-inverso totalmente D). Un péptido retro-inverso totalmente D de la invención proporcionaría un péptido con propiedades funcionales similares a las del péptido nativo donde los grupos laterales de los aminoácidos componentes corresponderían a la alineación del péptido nativo, pero que conservaría un esqueleto resistente a la proteasa.

Los péptidos retro-inversos de la invención son análogos sintetizados utilizando aminoácidos D mediante la unión de los aminoácidos en una cadena peptídica de modo que la secuencia de aminoácidos en el análogo del péptido retro-inverso es exactamente opuesta a la del péptido seleccionado que sirve como modelo. Por ejemplo, si la proteína TAT natural (formada por aminoácidos L) tiene la secuencia GRKKRRQRRR [SEQ ID N°: 5], el análogo de péptido retro-inverso de este péptido (formado por aminoácidos D) tendría la secuencia RRRQRRKKRG [SEQ ID N°: 6]. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar una cadena de aminoácidos D para formar los péptidos retro-inversos (véase, por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368,744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368,692-693 (1994); Guichard y col., J. Med. Chem. 39,2030-2039 (1996)). Específicamente, los retro-péptidos se produjeron mediante síntesis F-mock clásica y se analizaron mediante espectrometría de masas. Finalmente se purificaron por HPLC.

Dado que un problema inherente de los péptidos nativos es la degradación por proteasas naturales e inmunogenicidad inherente, los compuestos heterobivalentes o heteromultivalentes de esta invención se prepararán de modo que incluyan el "isómero retro-inverso" del péptido deseado. Por consiguiente, la protección del péptido frente a la proteólisis natural debería aumentar la eficacia del compuesto heterobivalente o heteromultivalente específico, tanto prolongando la vida media como disminuyendo la magnitud de la respuesta inmunitaria dirigida a la destrucción activa de los péptidos.

Ejemplo 10: Actividad biológica a largo plazo de los péptidos IB(s) retro-inversos totalmente D de la invención

La actividad biológica a largo plazo se predice para el heteroconjugado de péptido que contiene el D-TAT-IB(s) retro-inverso de la invención en comparación con el análogo de aminoácido L nativo debido a la protección del péptido D-TAT-IB(s) de la invención frente a la degradación por proteasas nativas, como se muestra en el Ejemplo 5.

Se analizó la inhibición de la muerte de células β pancreáticas inducida por IL-1 β mediante el péptido D-TAT-IB1(s) de la invención. Las células β TC-3 se incubaron tal como se describe más arriba durante 30 minutos con una única adición de los péptidos indicados (1 μ M). Después se añadió IL-1 (10 ng/ml).

Después de dos días de incubación con IL-1 β , las células apoptóticas se contaron empleando yoduro de propidio y tinción nuclear Hoechst 33342. En cada experimento se contó un mínimo de 1.000 células. Se indica el error estándar de la media (EEM), n=5. El péptido D-TAT-IB1 disminuyó la apoptosis inducida por IL-1 en una magnitud similar a la disminución lograda con los péptidos L-TAT-IB.

También se analizó la inhibición a largo plazo de la muerte celular inducida por IL-1P mediante el péptido D-TAT-IB1. Células β TC-3 se incubaron durante 30 minutos tal como se describe más arriba con una única adición de los péptidos indicados (1 μ M). Luego se añadió IL-1 β (10 ng/ml), seguida de la adición de la citoquina cada dos días. Después de 15 días de incubación con IL-1 se contaron las células apoptóticas usando yoduro de propidio y tinción nuclear Hoechst 33342. Obsérvese que una única adición del péptido TAT-IB1 no confiere protección a largo plazo. En cada experimento se contó un mínimo de 1.000 células. De

acuerdo con los resultados obtenidos, el D-TAT-IB1(s) de la invención proporcionó protección a largo plazo (15 días), pero el L-TAT-IB1(s) de la invención no lo hizo.

Ejemplo 11: Inhibición de la muerte de células β pancreáticas inducida por irradiación mediante péptidos TAT-IB(s)

5 La JNK también se activa mediante radiación ionizante. Para determinar si los péptidos TAT-IB(s) proporcionan protección contra los daños en JNK inducidos por radiación, se irradiaron células "WiDr" (30 Gy) en presencia o ausencia de los péptidos D-TAT, L-TAT-IB1(s) de la invención o D-TAT-IB1(s) de la invención (1 μ M añadido 30 minutos antes de la irradiación). Las células de control (CTRL) no se irradiaron. Las células se analizaron 48 horas después mediante YP y tinción Hoechst 3342, tal como se describe más arriba. N = 3,
10 se indican los EEM. Tanto los péptidos L-TAT-IB(s) como los péptidos D-TAT-IB1(s) de la invención previnieron la apoptosis inducida por irradiación en esta línea de cáncer de colon humano.

Ejemplo 12: Radioprotección frente a la radiación ionizante por los péptidos TAT-IB(s) de la invención

15 Para determinar los efectos radioprotectores de los péptidos TAT-IB(s), se irradiaron ratones C57B1/6 (2 a 3 meses de edad) con un rayo Phillips RT 250 R en una dosis de 0,74 Gy/min (17 mA, filtro Cu 0,5 mm). Treinta minutos antes de la irradiación, los animales recibieron una inyección i.p. de los péptidos TAT, L-TAT-IB1(s) de la invención o D-TAT-IB1(s) de la invención (301 de una solución 1 mM). En resumen, los ratones fueron irradiados de la siguiente manera: los ratones se dispusieron en pequeñas cajas de plástico con la cabeza fuera de la caja. Los animales se colocaron con la espalda bajo el radiador y el cuello fijado en un pequeño
20 túnel de plástico para mantener la cabeza en la posición correcta. El cuerpo se protegió con plomo.

Antes de la irradiación, los ratones se mantuvieron con comida en pellas estándar para ratones. Sin embargo, después de la irradiación los ratones fueron alimentados con una comida semilíquida que se renovaba cada día.

25 Después, 2 observadores independientes puntuaron la reacción de la mucosa labial de acuerdo con el sistema de puntuación desarrollado por Parkins y col. (Parkins y col., *Radiotherapy & Oncology*, 1: 165-173, 1983), teniendo en cuenta el estado del eritema y la presencia de edema, descamación y exudación. Además, los animales se pesaron antes de cada registro de su estado de eritema/edema.

Los resultados de estos experimentos indican que los péptidos TAT-IB(s) pueden proteger contra la pérdida de peso y los eritemas/edemas asociados a la radiación ionizante.

Ejemplo 13: Supresión de los factores de transcripción de JNK por los péptidos L-TAT-IB1(s)

30 Se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con una sonda marcada de forma doble con AP-1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3' (SEQ ID N°: 27). Unos extractos nucleares de células HeLa se trataron o no durante una hora con 5 ng/ml TNF- α , según se indica. El péptido TAT y el péptido L-TAT-IB1(s) de la invención se añadieron 30 minutos antes del TNF- α . Únicamente se muestra la parte del gel con el complejo
35 de ADN AP-1 específico (tal como se demuestra mediante experimentos de competición con competidores específicos y no específicos no marcados).

Los péptidos L-TAT-IB1(s) reducen la formación del complejo de unión ADN AP-1 en presencia de TNF- α .

Ejemplo 14: Evaluación de la neuroprotección contra isquemia cerebral focal en un modelo MCAO permanente - Determinación de la eficacia de la protección a diferentes dosis (Fig. 3)

40 A unas ratas de 12 días de edad se les indujo una isquemia cerebral focal. Las crías fueron anestesiadas en una cámara de inducción con un 2% de isoflurano y durante la operación se mantuvo la anestesia utilizando una máscara bajo un 2% de isoflurano. Se indujo una MCAO mediante electrocoagulación de una rama principal de la arteria cerebral media (*middle cerebral artery* - MCA). Las ratas se colocaron sobre el costado derecho y se practicó una incisión dérmica oblicua entre la oreja y el ojo. Después de la escisión del músculo
45 temporal se retiró el hueso craneal desde la sutura frontal hasta un nivel por debajo del arco cigomático. La MCA izquierda, expuesta justo después de su aparición por encima del surco rinal, se electrocoaguló de forma permanente a nivel de la vena cerebral inferior antes de que la bifurcación de la MCA en las ramas frontal y parietal. Después se cerró la incisión en la piel craneal. Las crías de rata se dispusieron en una incubadora a 37°C hasta que se despertaron y después fueron llevadas con su madre. Seis horas después se
50 inyectó vía intraperitoneal un péptido D-TAT-IB1(s) quimérico de la invención de SEQ ID N°: 11. Veinticuatro horas después de la coagulación, las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral y sometidas a perfusión a través de la aorta ascendente con paraformaldehído al 4% en PBS. Después se extirparon los cerebros y

se mantuvieron durante 2 horas en la misma solución fijadora, y se dispusieron en un gradiente de un 30% de sacarosa en PBS durante aproximadamente 15 horas a 4°C. Los cerebros se congelaron en isopentano (-40°C) y se guardaron a -20°C. Sobre unos portaobjetos se dispusieron secciones criostáticas coronales de 50 µm. Las secciones se tiñeron con violeta de cresilo. Se analizó cada décima sección y el volumen total de la lesión se calculó utilizando el programa Neuroleucida. En el grupo de control A, el volumen de lesión medio era de 21,47 mm³. Todos los grupos sometidos a tratamiento presentan una media menor que la del grupo de control. Entre el grupo A y los grupos C, E y F se observa una diferencia estadística significativa (prueba t una cola, p = 0,030, p = 0,002, p = 0,001, respectivamente). Los resultados se muestran en la Figura 4.

Como resultado, estos datos respaldan la conclusión de que el péptido D-TAT-IB1(s) quimérico de la invención de acuerdo con SEQ ID N°: 11, administrado en una dosis de 11 mg/kg, 3 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,03 mg/kg, contribuye a la protección cerebral. Los resultados obtenidos con dosis de 1 mg/kg, 0,003 mg/kg y 0,0003 en comparación con el grupo de solución salina sugieren que la muestra total no era suficientemente grande para lograr una diferencia significativa. La mejor protección se observa a una dosis de 0,03 mg/kg.

Ejemplo 15: Evaluación de la neuroprotección por los péptidos quiméricos después de administración i.v. contra isquemia cerebral focal en un modelo MCAO transitorio (Fig. 4)

Isquemia transitoria en ratones adultos. A unos ratones ICR-CD1 macho (6 semanas de edad; 18-37 g; Harlan) se les provocó una isquemia introduciendo un filamento desde la arteria carótida común hasta la carótida interna y haciéndolo avanzar hasta el círculo arterial, ocluyendo así la arteria cerebral media. Se midió el flujo sanguíneo cerebral regional por flujometría Doppler láser con una sonda fijada sobre el cráneo a lo largo de toda la isquemia hasta 10 minutos después de la reperusión. Se midió la temperatura rectal y ésta se mantuvo a 37°C. Los ratones fueron sacrificados 48 horas después de la reperusión. Se trazaron secciones criostáticas en serie de 20 µm utilizando un sistema de microscopio computarizado equipado con el programa NeuroLucida (MicroBrightField) y se calcularon los volúmenes del área isquémica y de todo el cerebro (a ciegas) con el programa Neuroexplorer.

XG-102 0,3 = 0,3 mg/kg, XG-102 1 = 1 mg/kg, XG-102 5 = 5 mg/kg

Después de la administración i.v. de un bolo placebo y XG-102 0,3, 1,3 mg/kg 6 horas después de la reperusión (30 minutos grapa) en un modelo de ratones adultos se obtuvieron los siguientes tamaños volumétricos de los infartos (mm³).

| | infartos | valor medio | tipo de desviación |
|--|-----------------|-------------|--------------------|
| | control n=5 | 72 | 17 |
| | XG102 0,3 n = 5 | 16 | 4 |
| | XG102 1 n = 1 | 16 | |
| | XG102 3 n = 5 | 15 | 5 |

Ejemplo 16: Ensayo en cultivos celulares midiendo la liberación de LDH después de estimulación con NMDA (Fig. 5)

El efecto neuroprotector del péptido D-TAT-IB (genérico)(s)/D-JNK11 (SEQ ID N°: 12) se evaluó en cultivos análogos tratados previamente durante 30 minutos con las concentraciones indicadas de péptidos o MK-801 antes de una exposición continua a NMDA 100 µM. Después de 12 horas de tratamiento con NMDA, en los cultivos previamente tratados con 5 µM de D-TAT-IB (genérico)(s)/D-JNK11 los cambios degenerativos debidos a la exposición a NMDA se inhibieron por completo tal como indica la ausencia de una liberación significativa de LDH por encima de los controles (Figura 5). El aspecto morfológico, la cantidad y la distribución de las neuronas son indistinguibles de los de los controles.

Cultivo neuronal cortical. Se diseccionaron pequeñas partes de corteza de cerebros de crías de rata de dos días de edad, que se incubaron con 200 unidades de papaína durante 30 minutos a 34°C. Después, las neuronas se dispusieron sobre placas en densidades de aproximadamente 1·10⁶ células/ placa sobre bandejas previamente revestidas con 100 µg/ml de poli-D-lisina. El medio de las placas consistía en B27/Neurobasal (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con glutamina 0,5 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH liberada en el medio del baño 12, 24 y 48 horas después de la administración de NMDA se midió utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactiva Cytotox 96 (Promega, WI) (véase la Figura 5).

Ejemplo 17: Inhibición de la actividad de JNK endógena en células HepG2 utilizando un método de pocillo “todo en uno”

El día antes del experimento se sembraron células HepG2 a razón de 3.000 células/pocillo. Después se añadieron concentraciones crecientes de interleucina-1 β [IL-1 β (v)] o de factor de necrosis tumoral α [TNF α (\bullet)] (a) para activar JNK durante 30 minutos. Las células se sometieron a lisis en Hepes 20 mM, 0,5% Tween pH 7,4 y se procesaron para AlphaScreen JNK. (b) Z' para la actividad de JNK inducida por 10 ng/ml IL-1 β y medida en 384 pocillos/placa (n=96). (c) Inhibición de actividad de JNK endógena inducida por IL-1 β mediante inhibidores de JNK químicos [staurosporina (\circ) y SP600125 (\bullet)]. (d) Efecto de los inhibidores peptídicos L-TAT-IB1 (s) de SEQ ID N $^\circ$: 9 [abreviada aquí como L-JNKi(v)] y D-TAT-IB1 (s) de acuerdo con SEQ ID N $^\circ$: 11 (abreviada aquí como D-JNKi(\blacklozenge)) y JBD (\bullet) (corresponde a L-JNKI sin la secuencia TAT) en la actividad de JNK dependiente de IL-1 α . Todos los paneles son representativos de tres experimentos independientes (n=3).

Métodos: Ensayo de quinasa AlphaScreen

Principio: AlphaScreen es una tecnología basada en perlas no radiactivas utilizada para estudiar interacciones biomoleculares en un formato de microplaca. El acrónimo ALPHA significa *Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay* (ensayo homogéneo de proximidad por luminiscencia amplificada). Este ensayo implica una interacción biológica que acerca estrechamente una perla "donante" y una perla "aceptadora". Después tiene lugar una cascada de reacciones químicas que producen una señal amplificada. Tras excitación por láser a 680 nm, un fotosensibilizador (ftalocianina) en la perla "donante" convierte el oxígeno ambiental en estado singlete excitado. En sus 4 μ s de vida media, la molécula de oxígeno singlete se puede difundir hasta aproximadamente 200 nm en solución y, si hay una perla "aceptadora" dentro de ese margen de proximidad, el oxígeno singlete reacciona con un derivado de tioxeno en la perla "aceptadora", generando una quimioluminiscencia a 370 nm que activa adicionalmente los fluoróforos contenidos en la misma perla "aceptadora". A continuación, los fluoróforos excitados emiten luz a 520-620 nm. En ausencia de perla "aceptadora", el oxígeno singlete cae al estado básico y no se produce ninguna señal.

En primer lugar se diluyeron reactivos de quinasa (B-GST-cJun, anticuerpo anti-P-cJun y JNK3 activa) en tampón de quinasa (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, MgCl $_2$ 10 mM, DTT 1 mM, Na $_3$ VO $_4$ 100 μ M, 0,01% Tween-20) y se añadieron a pocillos (15 μ l). Después se incubaron las reacciones en presencia de 10 μ M de ATP durante 1 h a 23 $^\circ$ C. La detección se llevó a cabo mediante adición de 10 μ l de mezcla de perlas (aceptador de Proteína A 20 μ g/ml y donante de Estreptavidina 20 μ g/ml), diluida en tampón de detección (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 20 mM, EDTA 80 mM, 0,3% BSA), seguida de otra hora de incubación a 23 $^\circ$ C en oscuridad. Para medir la actividad endógena de JNK se llevaron a cabo ensayos de quinasa tal como se describe más arriba, excepto que la JNK3 activa se sustituyó por lisados celulares y los componentes reactivos de quinasa se añadieron después de la lisis celular. El B-GST-cjun y el anticuerpo P-cJun se utilizaron en las mismas concentraciones, mientras que el ATP se utilizó en una concentración de 50 μ M en lugar de 10 μ M. La señal AlphaScreen se analizó directamente en el aparato Fusion o En Vision.

Ejemplo 18: Tratamiento de trauma por ruido

Se aplicó D-TAT-IB1(s) sobre la membrana de la ventana redonda de la cóclea de 3 grupos de cobayas (cada grupo con 6 animales) en 2 microlitros de una formulación de gel de un 2,6% de ácido hialurónico tamponado (Hylumed, Genzyme Corp.) en una concentración de 100 μ M bien 30 minutos antes del trauma por ruido (120 dB a 6 kHz durante 30 minutos), bien o 30 minutos o 4 horas después. Como control se utilizaron oídos no tratados. Los cambios en el umbral de audición se evaluaron mediante medida de la respuesta auditiva del tronco encefálico 20 minutos después del trauma por ruido (cambio temporal del umbral, TTS) y 15 días después del trauma (cambio permanente del umbral, PTS). La administración de D-TAT-IB1(s) protegió contra la pérdida permanente de audición incluso cuando se realizó después de la exposición a un ruido excesivo, en comparación con oídos no tratados. El efecto protector era más fuerte cuanto menor era el tiempo entre el trauma por ruido y la administración de D-TAT-IB1(s). Por consiguiente, D-TAT-IB1(s) es un compuesto otoprotector muy eficaz en caso de trauma por ruido.

A partir de la anterior descripción detallada de las realizaciones específicas de la invención, es evidente que se han descrito péptidos quiméricos bioactivos con permeabilidad celular y secuencias inhibitoras de JNK únicos. Aunque aquí se han dado a conocer detalladamente realizaciones particulares, se ha hecho a modo de ejemplo únicamente con fines ilustrativos, y no se ha de considerar que éstas limitan el alcance de las siguientes reivindicaciones adjuntas. En particular, el inventor cuenta con que se pueden realizar diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones de la invención sin salirse del espíritu y el alcance de la misma tal como se define en las reivindicaciones.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> XIGEN S.A.
- 5 <120> Inhibidores Peptídicos con Permeabilidad Celular de la vía de transducción de señales de JNK
- <130> UO01P006WO1
- <150> PCT/EP2005/009782
- 10 <151> 12-09-2005
- <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> Péptido L-IB1(s) (véase la Tabla 1)
- <400> 1

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

- 25 Ser Gln Asp
- <210> 2
- <211> 19
- <212> PRT
- 30 <213> Artificial
- <220>
- <223> Péptido D-IB1(s) (véase la Tabla 1)
- 35 <400> 2

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

- Lys Pro Arg
- <210> 3
- 40 <211> 18
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 45 <223> Péptido L-IB (genérico) (s) (véase la Tabla 1)
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(18)
- 50 <223> Fórmula general: NH₂-Xnb-Xna-RPTTLXLXXXXXXQD-Xnb-COOH, donde X es cualquier residuo aminoácido (nativo), Xna es cualquier residuo aminoácido excepto serina y treonina y Xnb puede ser cualquier residuo aminoácido;
- <220>
- 55 <221> repetición

ES 2 567 708 T3

- <222> (1)...(1)
 <223> Xaa es Xna-Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0 o 1 para Xna y 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 5 <220>
 <221> repetición
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 10 <400> 3
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Arg | Pro | Thr | Thr | Leu | Xaa | Leu | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | |
- Asp Xaa
- 15 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Péptido D-IB (genérico) (s) (véase la Tabla 1)
- 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> Fórmula general: NH₂-Xnb-DQXXXXXXXXLXLTPR-Xna-Xnb-COOH, donde X es cualquier residuo aminoácido (nativo), Xna es cualquier residuo aminoácido excepto serina y treonina y Xnb puede ser cualquier residuo aminoácido;
- 30 <220>
 <221> repetición
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 35 <220>
 <221> repetición
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa es Xna-Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0 o 1 para Xna y 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 40 <400> 4
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Asp | Gln | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Leu | Xaa | Leu | Thr | Thr | Pro |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
- Arg Xaa
- 45 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 50 <220>
 <223> Péptido L-TAT (véase la Tabla 1)
- <400> 5
- | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Lys | Lys | Arg | Arg | Gln | Arg | Arg | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | |
- <210> 6

- <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 5 <220>
 <223> Péptido D-TAT (véase la Tabla 1)
- <400> 6
- Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
 1 5 10
- 10 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> Péptido L-genérico-TAT (s) (véase la Tabla 1)
- 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> Fórmula general: NH₂-Xnb-RKKRRQRRR-Xnb-COOH, donde Xnb puede ser cualquier residuo aminoácido;
- 25 <220>
 <221> repetición
 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 30 <220>
 <221> repetición
 <222> (14)..(17)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 35 <400> 7
- Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
- Xaa
- 40 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 45 <220>
 <223> Péptido D-genérico-TAT (s) (véase la Tabla 1)
- <220>
 <221> misc_feature
- 50 <222> (1)..(17)
 <223> Fórmula general: NH₂-Xnb-RRRQRRKRR-Xnb-COOH, donde Xnb puede ser cualquier residuo aminoácido;
- <220>
- 55 <221> repetición
 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb

- <220>
 <221> repetición
 <222> (14)...(17)
 5 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- <400> 8
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Arg | Arg | Arg | Gln | Arg | Arg | Lys | Lys | Arg | Xaa | Xaa | Xaa |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
- Xaa
- 10 <210> 9
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> L-TAT-IB1 (s) (véase la Tabla 1)
- <400> 9
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Lys | Lys | Arg | Arg | Gln | Arg | Arg | Arg | Pro | Pro | Arg | Pro | Lys | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Thr | Thr | Leu | Asn | Leu | Phe | Pro | Gln | Val | Pro | Arg | Ser | Gln | Asp |
| | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 |
- 20 <210> 10
 <211> 38
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
- <220>
 <223> Péptido L-TAT (genérico) (s) (véase la Tabla 1)
- 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> Fórmula general: NH₂-Xnb-RKKRRQRRR-Xnb-Xna-RPTTLXLXXXXXXXXX-QD-Xnb-COOH, donde X es cualquier residuo aminoácido (nativo), Xna es cualquier residuo aminoácido excepto serina y treonina y Xnb puede ser cualquier residuo aminoácido;
- 35 <220>
 <221> repetición
 <222> (1)...(7)
 40 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- <220>
 <221> repetición
 <222> (17)...(21)
 45 <223> Xaa es Xna-Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0 o 1 para Xna y 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- <220>
 <221> repetición
 <222> (38)...(38)
 50 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb

<400> 10

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1           5           10           15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Thr Thr Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
20           25           30

Xaa Xaa Xaa Gln Asp Xaa
35
    
```

5 <210> 11
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido D-TAT-IB1 (s) (véase la Tabla 1)

<400> 11

```

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

Lys Pro Arg Pro Pro Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
20           25           30
    
```

15 <210> 12
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido: D-TAT (genérico) (s) (véase la Tabla 1)

25 <220>
 <221> misc. feature
 <222> (1)..(38)
 <223> Fórmula general: NH₂-Xnb-DQXXXXXXXXLXLTPR-Xna-Xnb-RRRQRR-KKR-Xnb-COOH, donde X es cualquier residuo aminoácido (nativo), Xna es cualquier residuo aminoácido excepto serina y treonina y Xnb puede ser cualquier residuo aminoácido;

30 <220>
 <221> repetición
 <222> (1)..(7)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb

35 <220>
 <221> repetición
 <222> (18)..(22)
 <223> Xaa es Xna-Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0 o 1 para Xna y 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb

40 <220>
 <221> repetición
 <222> (38)..(38)
 45 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb

<400> 12

ES 2 567 708 T3

Xaa Asp Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Leu Thr Thr Pro
 1 5 10 15

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35

- <210> 13
- <211> 29
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Péptido IB1-largo (véase la Tabla 1)

<400> 13

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

Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
 20 25

- 15 <210> 14
- <211> 27
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 20 <223> Péptido IB2-largo (véase la Tabla 1)

<400> 14

Ile Pro Ser Pro Ser Val Glu Glu Pro His Lys His Arg Pro Thr Thr
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp Ser
 20 25

- 25 <210> 15
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 30 <220>
- <223> Péptido derivado de c-Jun (véase la Tabla 1)

<400> 15

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

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

- 35 <210> 16

- <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 5 <220>
 <223> Péptido derivado de ATF2 (véase la Tabla 1)
- <400> 16
- Thr Asn Glu Asp His Leu Ala Val His Lys His Lys His Glu Met Thr
 1 5 10 15
- Leu Lys Phe Gly Pro Ala Arg Asn Asp Ser Val Ile Val
 20 25
- 10 <210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> Péptido L-IB1 (véase la Tabla 1)
- <400> 17
- Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
 1 5 10 15
- Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
 20
- 20 <210> 18
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> Péptido D-IB1 (véase la Tabla 1)
- 30 <400> 18
- Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
 1 5 10 15
- Arg Lys Pro Arg Tyr Thr Asp
 20
- <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 35 <220>
 <223> Péptido L-IB (genérico) (véase la Tabla 1)
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
- 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)

ES 2 567 708 T3

- <223> X se selecciona entre serina o treonina
- <220>
 <221> misc_feature
- 5 <222> (19)..(19)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
- <400> 19
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Arg | Pro | Thr | Thr | Leu | Xaa | Leu | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 |
- Asp Xaa Xaa
- 10 <210> 20
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> Péptido D-IB (genérico) (véase la Tabla 1)
- <220>
- 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
- <220>
- 25 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> X se selecciona entre serina o treonina
- <220>
- 30 <221> misc_feature
 <222> (3)..(19)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
- <400> 20
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Asp | Gln | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Leu | Xaa | Leu | Thr | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Pro Arg Xaa
- 35 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> Péptido L-genérico-TAT (véase la Tabla 1)
- <220>
- 45 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
- 50 <400> 21

ES 2 567 708 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa

- <210> 22
- <211> 17
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Péptido D-genérico-TAT (véase la Tabla 1)

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) .. (17)
- 15 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)

- <400> 22

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa

- 20 <210> 23
- <211> 35
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 25 <223> Péptido L-TAT-IB1 (véase la Tabla 1)

- <400> 23

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

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

Gln Asp Thr
 35

- 30 <210> 24
- <211> 42
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 35 <220>
- <223> Péptido L-TAT (genérico) (véase la Tabla 1)

- <220>
- <221> misc feature
- 40 <222> (1) .. (40)
- <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)

- <220>
- <221> misc_feature
- 45 <222> (41) .. (41)
- <223> X se selecciona entre serina o treonina

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (42) .. (42)
 5 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
 <400> 24
- ```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Thr Thr Leu Xaa Leu Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Asp Xaa Xaa
 35 40

```
- 10 <210> 25  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 15 <220>  
 <223> Péptido D-TAT-IB1 (véase la Tabla 1)  
 <400> 25
- ```

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

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

Lys Arg Gly
                35
  
```
- 20 <210> 26
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> Péptido D-TAT (genérico) (véase la Tabla 1)
- 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
- 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> X se selecciona entre serina o treonina;
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (42)
 <223> X es cualquier residuo aminoácido (nativo)
 <400> 26

ES 2 567 708 T3

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

Pro Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Arg Gln Arg Arg
20 25 30

Lys Lys Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40

- <210> 27
- <211> 21
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Sonda para ensayo de retardado en gel (véase el Ejemplo 13)

<400> 27
CGCTTGATGA GTCAGCCGGA A 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido quimérico que consiste en un primer dominio y un segundo dominio, y opcionalmente una secuencia enlazante, consistiendo el primer dominio en una secuencia de tráfico y consistiendo el segundo dominio en una secuencia inhibidora de JNK, donde el primer dominio consiste en la secuencia de aminoácidos todos retro-inverso D de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 y donde el segundo dominio consiste en la secuencia de aminoácidos todos retro-inverso D de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, estando unido el primer dominio al extremo C-terminal del segundo dominio tanto directamente como mediante dicha secuencia enlazante que consiste en 1 a 10 aminoácidos.
- 10 2. Péptido quimérico según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia enlazante contiene de 1 a 5 aminoácidos.
3. Péptido quimérico según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la secuencia enlazante está compuesta por aminoácidos L, aminoácidos D o una combinación de ambos.
- 15 4. Péptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la secuencia de tráfico aumenta la absorción celular del péptido.
5. Péptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la secuencia de tráfico dirige la localización nuclear del péptido.
6. Péptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el péptido quimérico tiene una modificación en el terminal C.
- 20 7. Péptido quimérico según la reivindicación 6, caracterizado porque el terminal C está modificado con una modificación de amida.
8. Composición farmacéutica que comprende un péptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Utilización de un péptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una fisiopatología seleccionada de entre tumores malignos de pulmón, de mama, linfoides, del tracto gastrointestinal y genitourinario y también adenocarcinomas, incluyendo tumores malignos tales como cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago, así como leucemia, cánceres con transformaciones oncogénicas Bcr-Abl, psoriasis, pénfigo vulgar, síndrome de Behcet, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SDRA), enfermedad cardíaca isquémica, síndrome posdiálisis, artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, vasculitis, *shock* séptico, reestenosis, pérdida de audición, traumas del oído, isquemia, apoplejía; lesiones de reperfusión, hipoxia, efectos secundarios debidos a tratamiento con citoquinas proinflamatorias, corazón diabético e hipertrofia cardíaca y lesiones arterioscleróticas, estados patológicos inducidos por radiación ionizante tal como se utiliza en la radioterapia y luz ultravioleta (luz UV), estados patológicos inducidos por agentes perjudiciales para el ADN, incluyendo fármacos quimioterapéuticos, hipotermia e hipertermia, enfermedades inflamatorias, autoinflamatorias, inmunes y autoinmunes, enfermedades degenerativas, miopatías, cardiomiopatías y rechazo de injertos.
- 30 10. Utilización de un péptido quimérico según la reivindicación 9, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del infarto cerebral, trauma cerebral, lesiones de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Parkinson.
- 35 11. Utilización según la reivindicación 9, caracterizada porque la composición farmacéutica se administra por una vía de administración seleccionada de entre el grupo consistente en las vías intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral y en parche.
- 40 12. *Kit* que comprende un péptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45

Secuencias genéricas, humano, ratón y rata

L-generic-TAT(s) : NH₂-XXXXXXXXXRRRXXXX-COOH
 L-TAT-IB (generic) (s): NH₂-XXXXXXXXXRRRXXXXRRPTTLXLXXXXXXXXDX-COOH
 L-TAT-IB (generic) : NH₂-XXXXXXXXXRRRXXXXRRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX-COOH

 D-generic-TAT(s) : NH₂-XXXXXXXXXRRRXXXX-COOH
 D-TAT-IB (generic) (s): NH₂-XDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRXXXXXX-COOH
 D-TAT-IB (generic) : NH₂-XT / SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRXXXXXX-COOH

Fig. 2

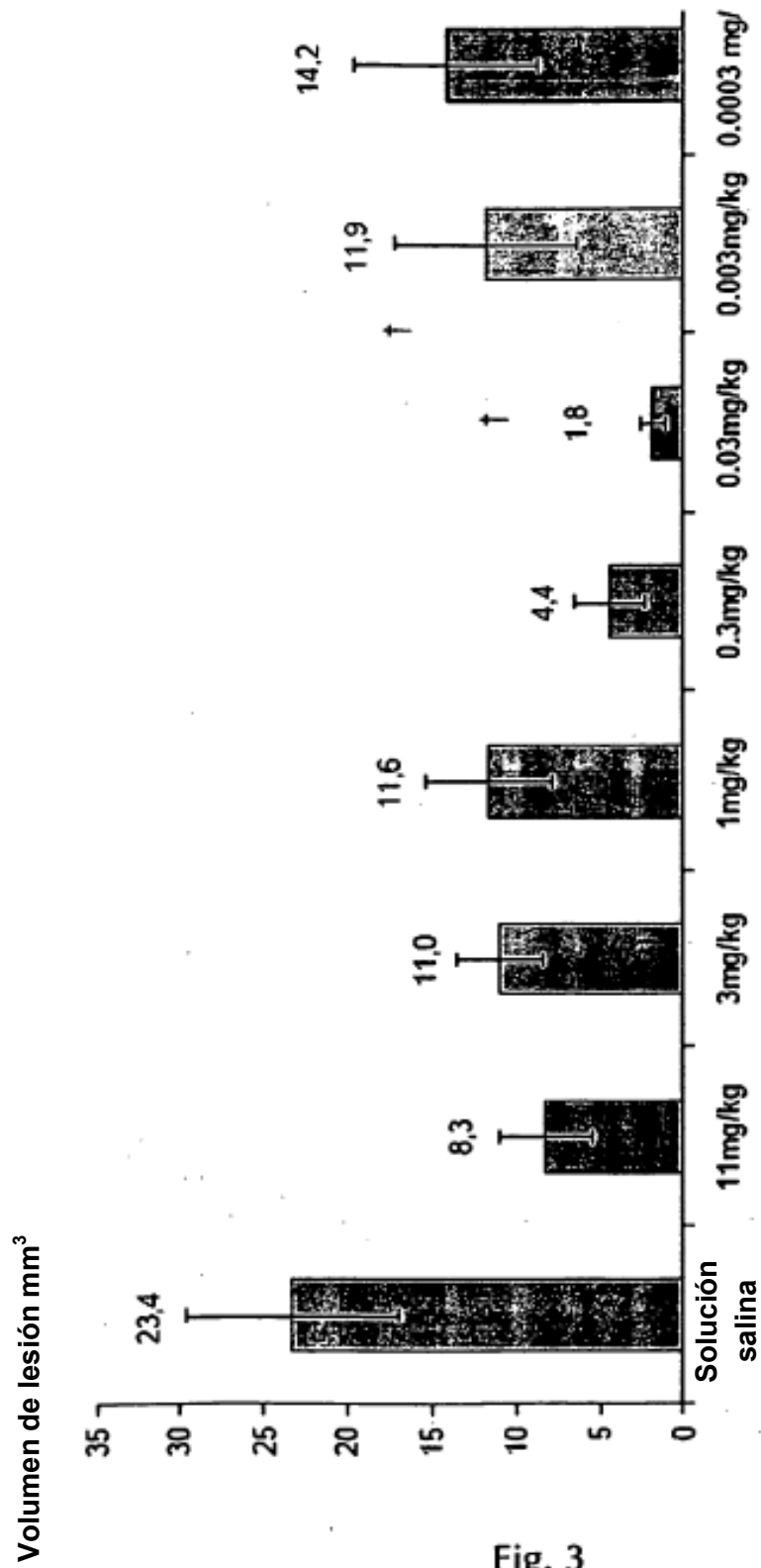


Fig. 3

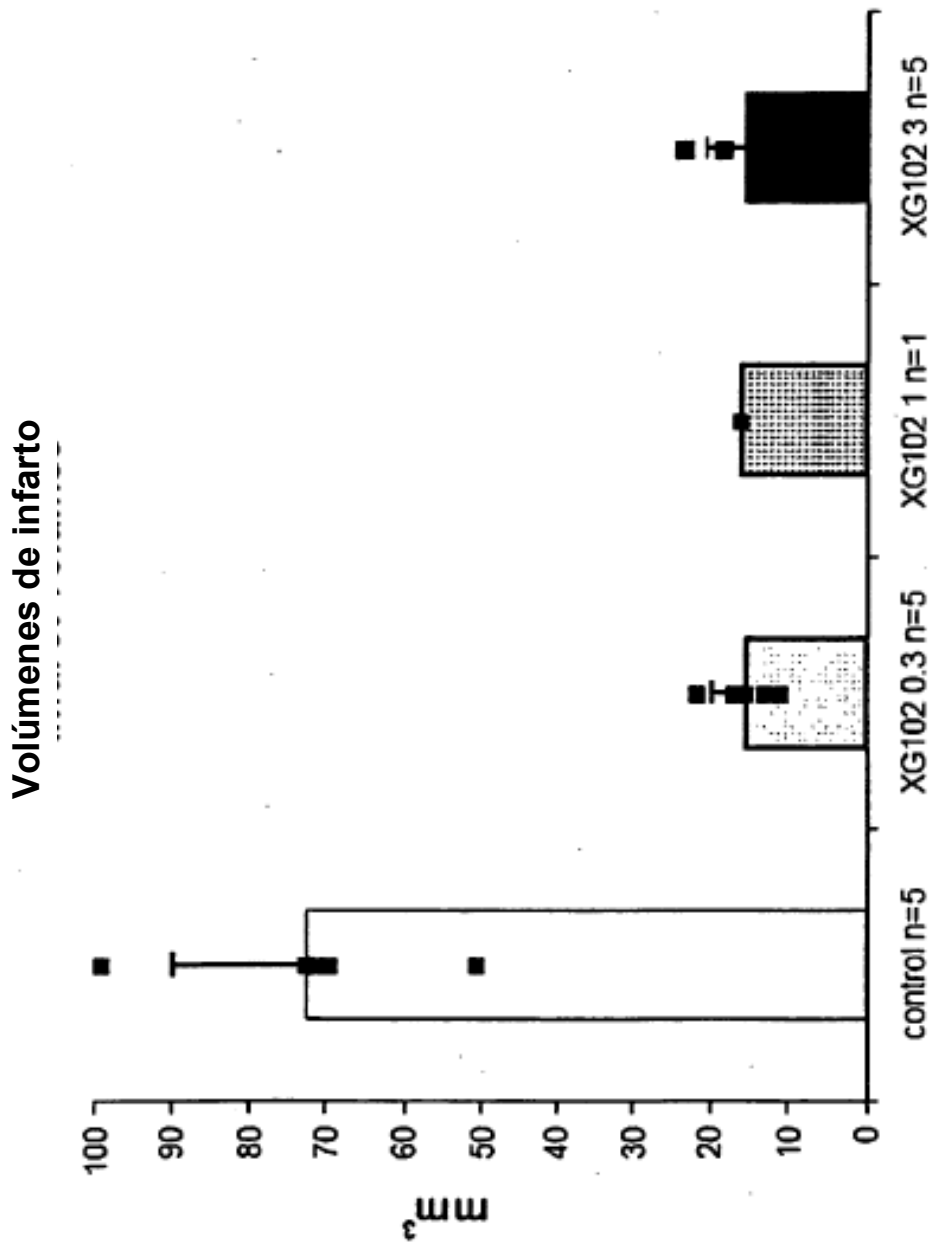


Fig. 4

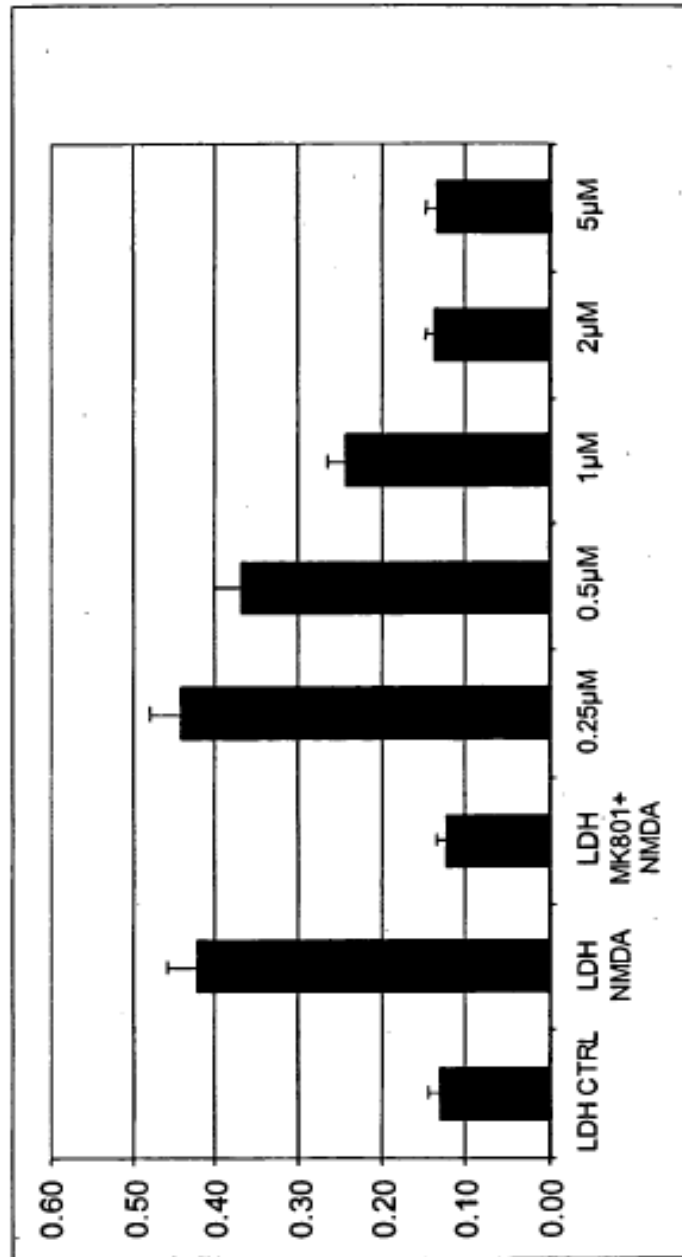


Fig. 5

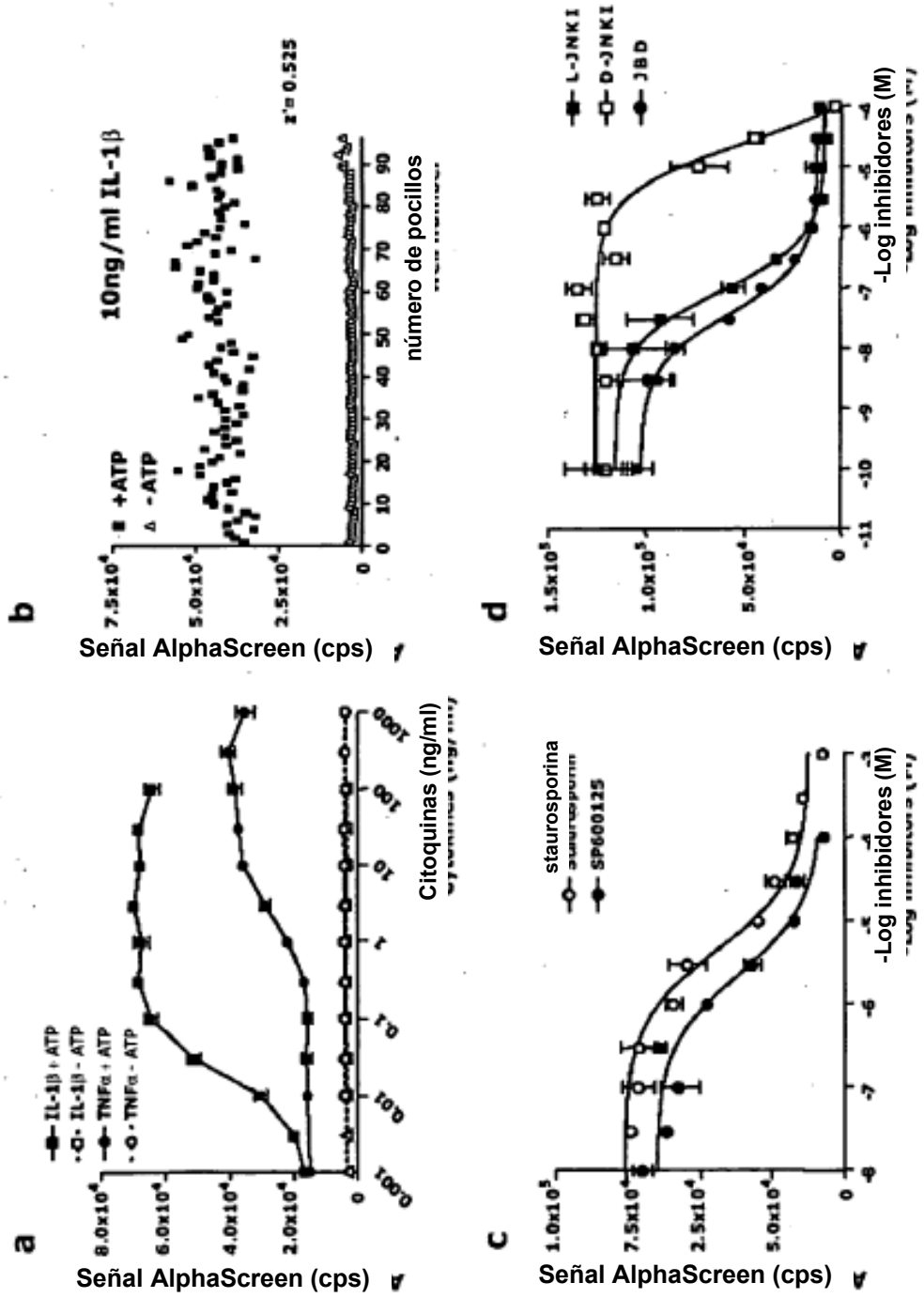


Fig. 6

Cambio del umbral dB SPL a
8 kHz

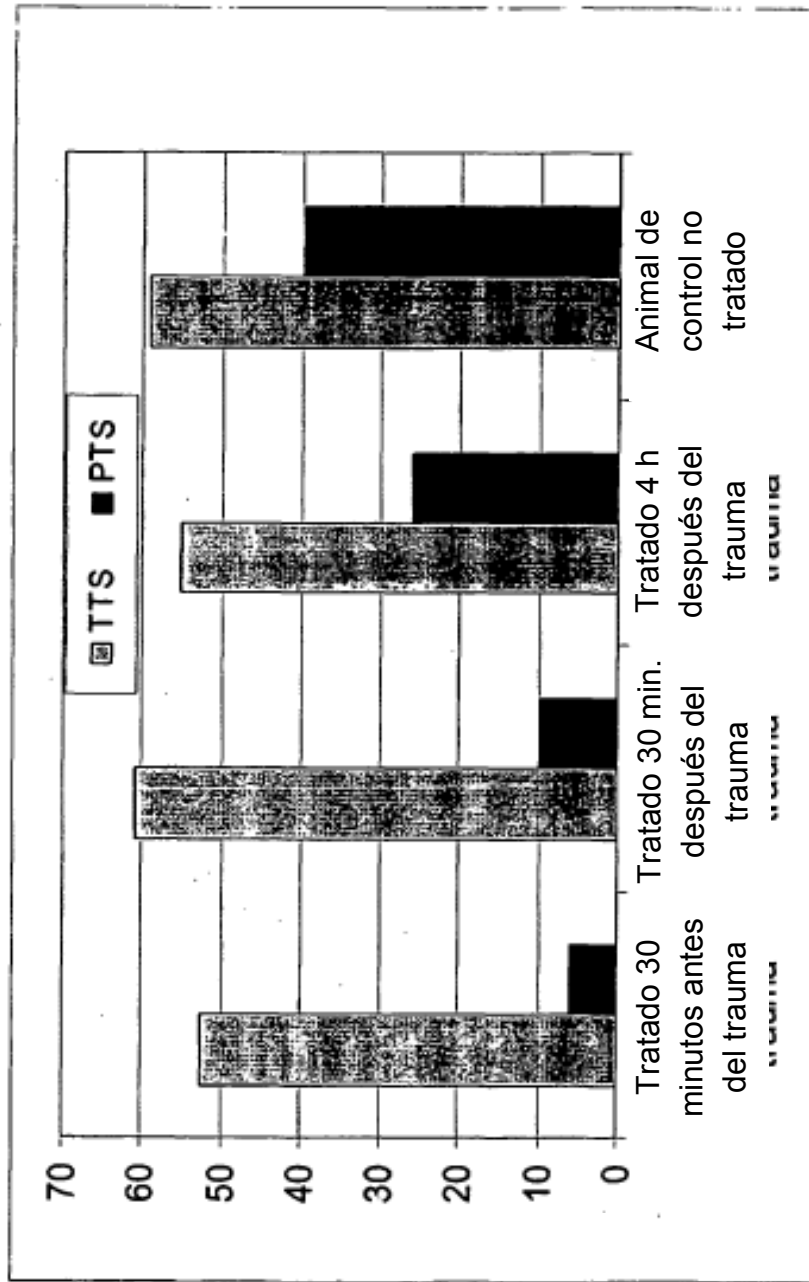


Fig. 7