

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 036**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008 E 14185916 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2839839**

54 Título: **Secuencias que se dirigen al núcleo**

30 Prioridad:

28.02.2007 US 903852 P

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

05.04.2018

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED (100.0%)
The Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SEGER, RONY y
CHUDERLAND, DANA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 036 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

Secuencias que se dirigen al núcleo

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a la translocación de proteínas y otros compuestos dentro y fuera del núcleo celular y, más particularmente, a nuevas secuencias de señales de localización nuclear.

10 Para asegurar un funcionamiento celular preciso, la distribución espacial de las proteínas tiene que estar estrictamente regulada y coordinada. Esto es particularmente evidente en muchas proteínas de señalización que cambian su localización de forma dinámica y rápida después de una estimulación extracelular. Con el fin de conservar tal regulación, el núcleo está separado del citoplasma a través de una envoltura de membrana doble que permite una entrada selectiva de proteínas a través de complejos de poro nuclear especializados (NPC). La selectividad de la localización nuclear está mediada principalmente por una señal de localización nuclear (NLS) recogida dentro de la secuencia de la proteína nuclear [G. Schlenstedt, FEBS Lett 389, 75 (24 de junio 1996)].

15 El tipo principal de NLS identificada hasta ahora se compone de aminoácidos básicos que se requieren para el mecanismo de entrada a través del NPC. Estas secuencias básicas son de dos tipos: (i) un único segmento de cinco a seis aminoácidos básicos, ejemplificados por la NLS del antígeno T grande del virus de simio (SV) 40; y (ii) una NLS bipartita compuesta por dos aminoácidos básicos, una región espaciadora de 10-12 aminoácidos y un grupo en el que tres de cinco aminoácidos tienen que ser básicos. Este tipo se caracteriza por la nucleoplasmina. Para que se produzca una importación al núcleo mediada por NLS, la NLS se asocia primero con las proteínas citosólicas del receptor de importación, importina α y β , lo que permite un acoplamiento en el lado citoplásmico del poro nuclear [E. J. Tran, S. R. Wenthe, Cell 125, 1041 (16 de junio 2006)]. El movimiento a través del poro nuclear está regulado por la GTPasa pequeña Ran, que en su estado unido a GTP promueve la disociación de la proteína importada desde las importinas y el reciclado de las mismas de vuelta al citoplasma [J. Moroianu, J Cell Biochem Suppl 32-33, 76 (1999)].

25 Sin embargo, no todas las proteínas transportadoras cito-nucleares contienen la NLS canónica y, por lo tanto, utilizan otros mecanismos, independientes de NLS, para su paso a través del NPC. Algunos de los mecanismos independientes de NLS caracterizados incluyen la difusión pasiva de pequeñas proteínas (<30-40 kDa), distintos motivos que dirigen hacia al núcleo [D. Christophe, C. Christophe-Hobertus, B. Pichon, Cell Signal 12, 337 (mayo, 2000)], la interacción con proteínas que contienen una NLS o, alternativamente, una interacción directa con proteínas del poro nuclear (NUPs); [L. Xu, J. Massague, Nat Rev Mol Cell Biol 5, 209 (marzo, 2004)]. Sin embargo, la cinética del transporte y la retención nuclear a través de estos mecanismos son generalmente demasiado lentas para permitir una transcripción transitoria oportuna y, por lo tanto, el o los mecanismos moleculares que permiten la translocación rápida y reversible independiente de NLS, de las proteínas de señalización después de una estimulación, son todavía desconocidos.

35 Ejemplos de proteínas de señalización que se translocan al núcleo después de una estimulación, de una manera independiente de NLS, incluyen ERKs, MEKs y SMADs. La importancia de estas proteínas en la regulación de la proliferación y la diferenciación ha conducido a muchos estudios sobre la translocación al núcleo tanto de ERKs como de SMAD3. Aunque se sugirió inicialmente una posible participación de la maquinaria de NLS canónica en algunos sistemas, ahora se piensa que estas proteínas se pueden translocar al núcleo a través de su interacción directa con las NUPs [L. Xu, J. Massague, Nat Rev Mol Cell Biol 5, 209 (marzo 2004)].

40 Una vez en el núcleo, muchas proteínas se transportan de vuelta al citoplasma como una etapa esencial en su función biológica. La exportación de macromoléculas desde el núcleo también se basa en la existencia de una señal específica en el sustrato que se va a exportar. Por ejemplo, la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) sale del núcleo, lo que facilita la exportación del ARN vírico sin cortar ni empalmar [Pollard y Malim, Ann. Rev. Microbiol., 52: 491-532, 1998]. La exportación desde el núcleo de la proteína Rev está mediada por una secuencia específica de la señal de exportación nuclear (NES) que consiste en la secuencia rica en leucina, LPPLERLTL, que se encuentra también en las proteínas de otros virus [Dobbelstein et al., EMBO J. 16: 4276-4284, 1997]. Además, numerosas proteínas celulares, tales como I-KB y MEK, contienen NES que regulan la actividad biológica de estas proteínas mediante el control de su exportación desde el núcleo [Ullman et al., Cell 90: 967-970, 1997]. La secuencia de consenso de NES es LXXLXXLXL y se ha mostrado que este tipo de secuencia interacciona con proteínas denominadas exportinas que median en una exportación rápida de las proteínas transportadoras.

55 La capacidad para regular la localización celular de un componente biológico es importante para muchas funciones tales como la regulación de la expresión del ácido nucleico, la transfección de células eucariotas, la terapia génica, la protección frente a productos químicos tóxicos y el transporte de agentes anticancerígenos. Por tanto, existe una necesidad ampliamente reconocida de identificar nuevas secuencias capaces de regular la translocación al núcleo y que sería altamente ventajosa.

Compendio de la invención

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que

no tiene más de 20 aminoácidos de longitud, comprendiendo la secuencia de aminoácidos:



en donde X_1 y X_3 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico;

- 5 en donde X_2 es prolina,
comprendiendo el péptido aislado una actividad dirigida al núcleo.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% homóloga a una secuencia como se indica por:



- 10 en la que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido, en donde el péptido aislado es capaz de evitar la translocación al núcleo de ERK.

De acuerdo con otro aspecto más, se proporciona una composición que comprende el péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 20 aminoácidos de longitud, comprendiendo la secuencia de aminoácidos:

- 15 $X_1 X_2 X_3;$

en donde X_1 y X_3 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico;

en donde X_2 es prolina,
comprendiendo el péptido aislado una actividad dirigida al núcleo,

- 20 y una sustancia heteróloga ligada a la secuencia de aminoácidos a través de un enlazador.

De acuerdo con todavía otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 20 aminoácidos de longitud, comprendiendo la secuencia de aminoácidos:



- 25 en donde X_1 y X_3 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico;

en donde X_2 es prolina,
comprendiendo el péptido aislado una actividad dirigida al núcleo.

- 30 De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% homóloga a una secuencia como se indica por:



en la que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido, en donde el péptido aislado es capaz de evitar la translocación al núcleo de ERK.

- 35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una estructura artificial de ácido nucleico que comprende los polinucleótidos aislados de la presente invención.

De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula aislada que comprende la estructura artificial de ácido nucleico de la presente invención.

- 40 De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un péptido para uso en un método para dirigir una sustancia al núcleo de una célula hospedadora, comprendiendo el método introducir la sustancia en la célula hospedadora, en donde la sustancia está fijada al péptido de la presente invención.

- 45 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un péptido para uso en un método para dirigir una sustancia al núcleo de una célula hospedadora, comprendiendo el método introducir el péptido de la presente invención en la célula hospedadora, en donde el péptido está ligado a un resto de afinidad capaz de reconocer la sustancia.

De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como agente activo la estructura artificial de ácido nucleico de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como agente activo la composición de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como agente activo el péptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con todavía un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar un agente capaz de modular la fosforilación de serina y/o treonina, comprendiendo el método:

(a) introducir una molécula en una célula hospedadora, en donde la molécula comprende:

i. un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 20 aminoácidos de longitud, comprendiendo la secuencia de aminoácidos:

15 $X_1 X_2 X_3$;

en donde X_1 y X_3 son cada uno independientemente serina o treonina;

en donde X_2 es prolina; y

ii. un resto detectable; y

20 (b) analizar la localización de la molécula en presencia y ausencia del agente, en donde un cambio en la localización de dicha molécula es indicativo de un agente capaz de modular la fosforilación de serina y/o treonina.

De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aislado de la presente invención en el sujeto, tratando de este modo la enfermedad hiperproliferativa.

25 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas a continuación, al menos uno de los aminoácidos es un aminoácido de origen natural.

De acuerdo con características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos uno de los aminoácidos es un aminoácido sintético.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos uno de los aminoácidos es un estereoisómero D.

30 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos uno de los aminoácidos es un estereoisómero L.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos uno de los aminoácidos es un estereoisómero L.

35 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la actividad dirigida al núcleo es regulable.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la actividad dirigida al núcleo es constitutiva.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia heteróloga está ligada a la secuencia de aminoácidos a través de un enlazador.

40 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido es tal como se indica en SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido es tal como se indica en SEQ ID NO: 3.

45 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, X_1 y X_2 no comprenden un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido es tal como se indica en SEQ ID NO: 5.

- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia heteróloga se selecciona a partir del grupo que consiste en un polipéptido, un ácido nucleico, una molécula pequeña y un carbohidrato.
- 5 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia heteróloga es un polipéptido.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia heteróloga es un agente farmacéutico.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente farmacéutico es un agente terapéutico, un agente cosmético o un agente de diagnóstico.
- 10 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición está ligada a un resto detectable a través de un enlazador.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el enlazador comprende un enlace peptídico.
- 15 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el enlazador comprende un enlace no peptídico.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición está ligada a un resto de afinidad a través de un enlazador.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto de afinidad se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo, un ligando receptor y un carbohidrato.
- 20 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la actividad dirigida al núcleo es regulable.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la actividad dirigida al núcleo es constitutiva.
- 25 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la estructura artificial de ácido nucleico comprende además un elemento regulador en cis para regular la expresión del polinucleótido.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el polinucleótido aislado se fusiona transcripcionalmente con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia heteróloga del polipéptido de interés.
- 30 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula aislada es eucariota.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula eucariota es una célula de levadura.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia es una sustancia endógena.
- 35 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia es una sustancia exógena.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además la administración de dicha sustancia exógena a la célula hospedadora antes de, junto con o después de la introducción.
- 40 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula hospedadora es una célula en división.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula hospedadora es una célula que no se está dividiendo.
- 45 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia se selecciona a partir del grupo que consiste en un polipéptido, un ácido nucleico, una molécula pequeña y un carbohidrato.
- De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la sustancia es un ácido nucleico.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el ácido nucleico se introduce en la célula hospedadora mediante un método seleccionado a partir del grupo que consiste en: microinyección, electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, introducción con DEAE dextrano, introducción mediada por liposomas, introducción mediada por virus, inyección de ADN desnudo y bombardeo biolístico.

5 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la acción de dirigir hacia una diana se realiza *in vivo*.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la acción de dirigir hacia una diana se realiza *ex vivo*.

10 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la acción de dirigir hacia una diana se realiza *in vitro*.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula hospedadora es una célula eucariota.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula eucariota es una célula de levadura.

15 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además activar la fosforilación del polipéptido de la presente invención en la célula hospedadora después de la introducción.

20 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la fosforilación activadora se efectúa mediante un agente seleccionado a partir del grupo que consiste en TPA, VOOH, TGFβ y EGF.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto detectable no es no detectable directamente.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto no detectable directamente es un sustrato para una reacción enzimática capaz de generar un producto detectable.

25 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto detectable es detectable directamente.

De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto detectable directamente se selecciona a partir del grupo que consiste en un agente fosforescente, un agente quimioluminiscente y un agente fluorescente.

30 De acuerdo con todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la enfermedad hiperproliferativa es cáncer.

La presente invención se dirige con éxito a las deficiencias de las configuraciones conocidas actualmente, proporcionando nuevas señales de translocación al núcleo.

Breve descripción de los dibujos

35 La invención se describe en el presente documento solo a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora referencia específica con detalle a los dibujos, se hace hincapié en que los detalles mostrados son solamente a modo de ejemplo y para fines de una exposición ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para ofrecer una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada junto con los dibujos evidencia a los expertos en la técnica cómo se pueden ejemplificar las diversas formas de la invención en la práctica.

40

En los dibujos:

45 Las FIGs. 1A-R son microfotografías que ilustran el papel de SPS en la acumulación no regulada de ERK2 en el núcleo. Las células CHO (Figuras 1A-F y 1M-R) o COS7 (Figuras 1G-L) se cultivaron sobre cubreobjetos y se transfectaron con WT-ERK2 o los mutantes 244-6A y Δ244-6. Veinticuatro horas después de la transfección, se privó a las células de suero (16 h), se fijaron, se tiñeron con DAPI y se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia.

50 Las FIGs. 2A-X son microfotografías que ilustran el papel de SPS en la translocación al núcleo estimulada de ERK2. Las células CHO se cultivaron sobre cubreobjetos y cotransfectaron con HA-MEK1 junto con WT-ERK2, 244-6A o Δ244-6. Veinticuatro horas después de la transfección, se privó a las células de suero durante 16 horas, se trataron

con TPA (250 nM, 15 min), excepto en WT-10, en donde las células fueron tratadas con TPA 10 nM durante 15 min. Después de los tratamientos, las células se fijaron y se tiñeron con Ac anti-HA o DAPI.

La FIG. 3 es una autorradiografía que ilustra el equilibrio de la fosforilación de ERK con diferentes concentraciones de TPA. La fosforilación de ERK2 se detectó mediante un análisis de transferencia Western usando Acs anti-fosfoTEY-ERK (α pTEY) y anti-ERK (α gERK).

Las FIGs. 4A-I son autorradiografías que caracterizan la fosforilación de SPS usando un Ac para el dominio SPS fosforilado. La Figura 4A ilustra una elevación de la detección de pSPS después de la estimulación. Las células COS se transfectaron con WT-GFP-ERK2. Veinticuatro horas después de la transfección, se privó a las células de suero durante 16 h y posteriormente se trataron con el estimulador general VOOH (V, Na_3VO_4 100 μM y H_2O_2 200 μM , 15 min), TPA (T, 250 nM, 15 min), EGF (E, 50 ng/ml durante 15 min), o se dejaron sin tratar (NT). La GFP-ERK2 inmunoprecipitó con Ac anti GFP, se lavó a fondo y luego el IP se sometió a transferencia Western con Acs anti fosfo SPS-ERK (α phoSPS-ERK) y anti ERK general (α gen-ERK). La Figura 4B es un curso de tiempo de la fosforilación de SPS. Las células COS7 que expresan en exceso WT-GFP-ERK2 fueron privadas de suero seguido de una estimulación con EGF en los puntos de tiempo indicados. Los materiales lisados se sometieron después a análisis de transferencia Western como en la Figura 4A. Figuras 4C-D. GFP-ERK2 inmunoprecipitó desde las células COS7 transfectadas, estimuladas con VOOH (Act) o no estimuladas (NT), como anteriormente. A continuación, la proteína inmunoprecipitada se incubó con fosfatos alcalinos de camarón (SAP, 15 unidades, 30 min, 30°C en el tampón de digestión del fabricante) y se sometió a un análisis de transferencia Western con Ac anti fosfoSPS-ERK (α pSPS; Figura 4C), anti fosfoTEY-ERK (α pTEY; Figura 4D) y anti ERK general (α gen-ERK; Figuras 4C, D). Figura 4E. Elevación de la inmunorreactividad del Ac anti pSPS después de la estimulación de ERKs endógenas. Después de la privación de suero, las células COS7 fueron tratadas con EGF (50 ng/ml) o VOOH (V, Na_3VO_4 100 μM y H_2O_2 200 μM) durante los tiempos indicados. La fosforilación de SPS se detectó utilizando los Acs anti pSPS y esta se comparó con la cantidad de ERKs generales detectadas mediante α gERK. Figura 4F. Especificidad del Ac anti pSPS. A las células COS7 que expresaban en exceso GFP-ERK2 o el mutante 244-6A se les privó de suero durante 16 h y después se trataron con EGF (50 ng/ml) durante 15 min después de un análisis WB usando Acs α pSPS y α gERK. Figura 4G. La fosforilación de TEY no es necesaria para la fosforilación de SPS. Se trataron células COS7 que expresan en exceso WT-ERK2 o TEY-AAA como se ha descrito en D. Figura 4H. Las células COS7 fueron tratadas con o sin UO126 antes de (15 min) la estimulación con EGF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. La fosforilación de SPS se detectó utilizando los Acs α pSPS y α gERK. Figura 4I. La fosforilación de SPS está mediada por una autofosforilación de ERK. WT-ERK2, TEY-AAA o ERK-APA (SPS-APA) inmunoprecipitadas, lavadas a fondo, se sometieron a un ensayo con cinasa *in vitro*, en donde GST-ERK2 (GST-ERK), Act-GST-ERK2 (Act-ERK) o GST-KA-ERK2 (KA-ERK) actúan como una cinasa. La fosforilación (^{32}P -ERK2) de ERK y sus mutantes se detectó mediante autorradiografía. La igualdad de carga fue confirmada por WB utilizando Ac anti gERK.

Las FIGs. 5A-F son microfotografías que ilustran que la mutación de los residuos de Ser a Glu en SPS induce la acumulación nuclear de ERK2. Las células CHO se cultivaron sobre cubreobjetos y se transfectaron con WT-GFP-ERK2 (WT), APA-GFP-ERK2 (APA) o EPE-GFP-ERK2 (EPE). Veinticuatro horas después de la transfección, se privó a las células de suero, se fijaron, se tiñeron con DAPI y se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia.

La FIG. 6 es una autorradiografía que ilustra el fraccionamiento subcelular de WT-GFP-ERK2 (WT), APA-GFP-ERK2 (APA) o EPE-GFP-ERK2 (EPE). Las células COS7 se cultivaron en placas de 10 cm y se transfectaron con las estructuras artificiales de ERK2 anteriores. Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero durante 16 horas y se sometieron a un fraccionamiento celular, tal como se describe en Materiales y Métodos. Análisis de transferencia Western de partes alícuotas de las fracciones se tiñeron con Ac anti GFP para detectar la ERK2 y su mutante y con Acs anti tubulina y anti c-Jun como marcadores para las fracciones citoplasmáticas y nucleares, respectivamente.

Las FIGs. 7A-H son microfotografías que ilustran que EPE-ERK se transloca al núcleo más rápido que WT-ERK. Las células CHO fueron transfectadas con WT-GFP-ERK2 (WT) y EPE-GFP-ERK2 (EPE). Ocho horas (Figuras 7A-D) o doce horas (Figuras 7E-H) después de la transfección, las células se fijaron, se tiñeron con DAPI y se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia.

Las FIGs. 8A-H son microfotografías que ilustran que los péptidos SPS, APA y EPE fusionados a una quimera 2GFP modifican su localización subcelular. Las células CHO se cultivaron sobre cubreobjetos y se transfectaron con 19 aminoácidos del dominio de inserción de cinasa de ERK2 incluyendo la región SPS (GFP-SPS) fusionada con una quimera 2GFP y con las mismas quimeras sustituyendo la Ser por Ala (GFP-APA) o sustituyendo por Glu (GFP-EPE). Veinticuatro horas más tarde, las células fueron privadas de suero durante 16 h, se fijaron, se tiñeron con DAPI y se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia.

La FIG. 9A es una autorradiografía que ilustra el fraccionamiento subcelular de los péptidos SPS, APA y EPE transfectados, fusionados a una 2GFP en células COS7. Los análisis con transferencia Western de partes alícuotas de las fracciones, se tiñeron con Ac anti GFP para detectar las diferentes quimeras y con Acs anti tubulina y anti c-Jun como marcadores para las fracciones citoplasmáticas y nucleares, respectivamente.

La FIG. 9B es una autorradiografía que ilustra que la estimulación eleva la fosforilación de pSPS en la estructura artificial 2GFP-SPS. Células COS7 que expresaban en exceso la estructura artificial 2GFP-SPS, fueron privadas de suero seguido de una estimulación con VOOH (V, Na₃VO₄ 100 μM y H₂O₂ 200 μM, 15 min) y EGF (E, 50 ng/ml, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). 2GFP-SPS inmunoprecipitó con Ac anti GFP, se lavó a fondo y las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a WB utilizando Ac anti-pSPS (qpSPS). La cantidad total de 2GFP-SPS inmunoprecipitada se detectó con Ac αGFP.

Las FIGs. 10A-X ilustran los efectos de las quimeras 2GFP sobre la translocación al núcleo de ERKs endógenas. Células CHO que expresaban en exceso 2GFP, 2GFP-SPS, 2GFP-APA y 2GFP-EPE fueron privadas de suero y se trataron con o sin TPA (250 nM, 15 min). Posteriormente, las células se fijaron y se tiñeron con Ac anti-ERK2 (C-14) y con DAPI.

Las FIGs. 11A-D son microfotografías que ilustran que la mutación de SPS evita la translocación al núcleo de SMAD3 de longitud completa. Las células CHO que expresaban en exceso ya sea Flag-SMAD3 (SMAD3) o su mutante AAA (AAA-SMAD3) se fijaron y se tiñeron ambas con Ac anti Flag y DAPI.

La FIG. 11E es una autorradiografía que ilustra una elevación de la detección de pSPS después de la estimulación en SMAD3. Las células COS7 que expresaban en exceso Flag-SMAD3 fueron privadas de suero y después se estimularon con VOOH (V, Na₃VO₄ 100 μM y H₂O₂ 200 μM, 15 min), TPA (T, 250 nM, 15 min), TGFβ (TG, 1 ng/ml, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). FLAG-SMAD3 inmunoprecipitó con Ac anti Flag, se lavó a fondo y las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron entonces a WB con Acs anti-pSPS (qpSPS) o anti-Flag (αFlag).

Las FIGs. 12A-F son microfotografías que ilustran que los mutantes del dominio SPS modulan la translocación subcelular de la región MH2 de SMAD3. Las células CHO que expresaban en exceso el dominio MH2 de SMAD3 (WT-MH2) o el mutante AAA (AAA-MH2) y DPD (MH2-DPD), se fijaron y se visualizaron con un microscopio fluorescente.

La FIG. 13 es una autorradiografía que ilustra el fraccionamiento subcelular de las estructuras artificiales de MH2 descritas en las células COS7. Los análisis de transferencia Western de partes alícuotas de las fracciones se tiñeron con Ac anti GFP para detectar MH2-SMAD3 y su mutante y con Acs anti tubulina y anti c-Jun como marcadores para las fracciones citoplasmáticas y nucleares, respectivamente.

Las FIGs. 14A-R son microfotografías que ilustran que el motivo NTS regula el transporte de MEK1 al núcleo. Las células CHO que expresaban en exceso WT-GFP-MEK1 (WT), AAA-GFP-MEK1 (AAA-MEK) y EPE-GFP-MEK1 (EPE-MEK) fueron privadas de suero durante 16 horas y se trataron con LMB (5 ng/ml, 1 h; LMB), LMB (5 ng/ml, 1 h) + TPA (250 nM, 15 min; LMB + TPA) o se dejaron sin tratar (NT). Posteriormente las células se fijaron, se tiñeron con DAPI y se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia.

Las FIGs. 15A-R son microfotografías que ilustran que la fosforilación de SPS regula la importación nuclear y no la exportación de ERK2. Las células CHO que expresaban en exceso WT-ERK, mutantes APAERK2 o EPE-ERK2, fueron privadas de suero durante 16 horas y se trataron con OMB (5 ng/ml, 1 hora). LMB + TPA (5 ng/ml de LMB durante 45 minutos seguido de TPA 20 nM durante 15 minutos adicionales) o se dejaron sin tratar (NT). Posteriormente, las células se fijaron, se tiñeron con DAPI y se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia.

La FIG. 16 es un gráfico de barras que ilustra que la prevención de la fosforilación de SPS inhibe la proliferación. Las células COS7 que expresaban en exceso WT-ERK2, 244-6A-ERK2, ▲244-6-ERK2, APA-ERK2 o EPE-ERK2 se sometieron a un ensayo de proliferación, 72 horas después de la transfección. El gráfico de barras representan la media +/- SD (n=3), se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico (*, p <0,01).

Las FIGs. 17A-B son microfotografías que ilustran el efecto del agotamiento de la importina-7 sobre la localización de SMAD3 y MEK1. Figura 17A. La translocación de SMAD3 inducida por TGFβ se evita mediante el ARNsi de importina-7 (SEQ ID NOS: 28-31). Las células HeLa se transfectaron con ARNsi de importina-7 o ARNsi de control (secuencia desordenada usando oligofectamina). Setenta y dos horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero y luego o bien se trataron con TGFβ (1 ng/ml; 20 minutos) o se dejaron sin tratar como control. Posteriormente, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con Ac anti-SMAD3 (Cell Signaling USA) y DAPI. Figura 17B. La translocación al núcleo de MEK1 inducida con EGF se evita parcialmente mediante el ARNsi de importina-7. Las células HeLa se transfectaron con ARNsi contra importina 7 o de control. Setenta y dos horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero y luego o bien se trataron con LMB + EGF (5 ng/ml de LMB durante 45 minutos, seguido de 50 ng/ml de EGF durante 15 minutos) o se dejaron sin tratar como un control. Posteriormente, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con Ac anti-MEK (Santa Cruz, EE.UU.) y DAPI.

Las FIGs. 18A-G son microfotografías y autorradiografías que ilustran que la translocación al núcleo activa de ERKs está mediada por importina-7 y Ran-GTP. Figura 18A. La translocación de ERKs inducidas con EGF se evita mediante el ARNsi de importina-7 (SEQ ID NOS: 28-31). Las células HeLa fueron transfectadas con ARNsi de importina-7 o ARNsi de control desordenado usando oligofectamina. Setenta y dos horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero como se ha descrito en las Figuras 1-3 y luego se trataron bien con EGF (50 ng/ml, 15 min) o se dejaron sin tratar como control. Posteriormente, las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con

Ac anti gERK y DAPI. Figura 18B. La acumulación nuclear de WT-GFP-ERK2 no se ve afectada por el ARNsi de importina-7. Las células HeLa que expresaban en exceso el ARNsi contra importina-7 o de control (72 h después de la transfección) se cotransfectaron adicionalmente con WT-GFP-ERK2 (GFP-ERK2). Cuarenta y ocho horas después de esta transfección, las células fueron privadas de suero y después se fijaron y se tiñeron con DAPI.

5 Figura 18C. El ARNsi de importina-7 efectivamente inhibe su propia expresión. Se recogieron las células HeLa que expresaban en exceso el ARNsi de importina-7 o de control (72 h después de la transfección, oligofectamina) y se sometieron a análisis WB usando Acs anti-importina-7 (α Imp7) y anti ERK general (α gERK). Figura 18D. La interacción de GFP-ERK con importina-7 es dependiente de la estimulación. Las células HeLa que expresaban en exceso GFP-ERK2 o una GFP de control fueron privadas de suero y después se trataron con o sin EGF (50 ng/ml,

10 15 min). Esto vino seguido por una coimmunoprecipitación usando perlas A/G preconjugadas con Ac anti GFP y lavados suaves. La cantidad de importina-7 coimmunoprecipitada (panel superior) y la cantidad de GFP o GFP-ERK2 inmunoprecipitada (panel inferior) se determinó mediante un análisis WB usando Acs α Imp7 y anti-GFP (α GFP). Figura 18E. La interacción de importina-7 con ERK2 endógena se eleva mediante la estimulación de EGF. Las células HeLa privadas de suero se trataron con EGF (50 ng/ml) durante 0, 5 y 15 min (0, E5 y E15) y después se sometieron a coimmunoprecipitación usando perlas de A/G preconjugadas con Ac anti ERK2 o a una precipitación simulada solo con perlas (B). La cantidad de importina-7 coimmunoprecipitada (panel superior), la cantidad de ERKs inmunoprecipitadas (panel inferior) y un marcador de la carga (L), se determinaron mediante un análisis WB usando Acs α Imp7 y α gERK. Figura 18F. La importina-7 interacciona con RanGTP pero no con RanGDP o Ran sin carga. La importina-7 inmunoprecipitada procedente de células HeLa se lavó a fondo y se incubó con 1 μ g de 6His-Ran cargado previamente (1 h, 4°C) con GDP (Ran-GDP), GTP (Ran-GTP) o tampón de control (sin guanidina, NG). Posteriormente, las perlas se lavaron suavemente y se sometieron a un análisis WB usando Acs α Imp7 y anti His (α His). Figura 18G. Ran-GTP anula la interacción ERK2-importina-7. La coimmunoprecipitación de GFP-ERK2 con importina-7 se realizó como se ha descrito en la Figura 18E, en presencia de 1 μ g de Ran-GDP o 1 μ g de Ran-GTP. La cantidad de Imp7 coimmunoprecipitada y de GFP-ERK2 precipitada se detectó empleando Acs α Imp7 y α gERK.

25 Las FIGs. 19A-C son autorradiografías que ilustran que fosfo-SPS interacciona con importina-7 y libera la unión de Nup153c sin implicación de la importina- β . Figura 19A. La interacción de ERK2 con importina-7 se ve reforzada por la estimulación de EGF y la mutación EPE. Las células HeLa que expresaban en exceso WT-ERK (WT), ERK-APA (APA), ERK-EPE (EPE) o GFP fueron privadas de suero y se trataron con EGF (50 ng/ml, 10 min). Los extractos de las células tratadas se sometieron después a coimmunoprecipitación usando perlas A/G preconjugadas con Ac anti GFP y lavados suaves. La importina-7 (primer panel) y la importina- β (tercer panel) coimmunoprecipitadas, así como sus cantidades de carga (paneles 2 y 4, respectivamente) se determinaron por WB utilizando Acs anti importina-7 (α Imp7) e anti importina- β (α Imp β). La cantidad igual de ERKs inmunoprecipitadas se determinó con Ac anti GFP (α GFP; IP). Figura 19B. Interacción de 2GFP-SPS y sus mutantes con la importina-7. Las células HeLa que expresaban en exceso las estructuras artificiales 2GFP, 2GFP-SPS, 2GFP-APA y 2GFP-EPE se sometieron a coimmunoprecipitación como se ha descrito en la Figura 19A (sin estimulación con EGF). Figura 19C. Interacción de NUP153 con WTERK2 y sus mutantes APA y EPE. NUP153c es elevada en APA-ERK2, pero reducida en EPE-ERK2. WT-ERK2 (WT), APA-ERK2 (APA) o ERK2 inmunoprecipitadas y lavadas a fondo procedentes de células COS7 pretratadas con o sin TPA (250 nM, 15 min), se incubaron con 0,5 μ g de His-Nup153c recombinante. Esto vino seguido de un lavado suave y las perlas se sometieron después a un análisis de transferencia Western utilizando Ac anti His (α His) y anti α GFP.

30 35 40

La FIG. 20 es una alineación de secuencias entre la región NTS de ERK2, SMAD3 y MEK1 (SEQ ID NOs: 32, 33 y 34 respectivamente). Todas las secuencias son de origen humano.

Descripción de las realizaciones preferidas

45 La presente invención trata de nuevas señales de translocación al núcleo que se pueden utilizar para dirigir una sustancia heteróloga (ya sea constitutivamente o de manera regulable) al núcleo. Además, las secuencias señal de la presente invención se pueden usar para regular la translocación al núcleo de proteínas que comprenden de manera endógena tales señales de translocación al núcleo.

Los principios y el funcionamiento de la señal de localización nuclear de acuerdo con la presente invención se puede entender mejor haciendo referencia a los dibujos y las descripciones acompañantes.

50 La invención tiene capacidad para otras realizaciones o se puede poner en práctica o llevar a cabo de diversas maneras. También se entiende que el lenguaje y la terminología empleados en el presente documento tienen el fin de describir.

La capacidad para regular la localización celular de un componente biológico es importante para muchas funciones tales como la regulación de la expresión del ácido nucleico, la transfección de células eucariotas, la terapia génica,

55 la protección frente a productos químicos tóxicos y el transporte de agentes anticancerígenos.

A través de una experimentación meticulosa, los presentes inventores han identificado una región reguladora, presente en las proteínas de señalización, tales como la proteína cinasa P42 MAP (ERK2), SMAD3 y la proteína cinasa 1 activada por mitógeno (MEK1), que participa en la translocación al núcleo de las mismas después de una estimulación extracelular. La delección de esta región reguladora impide la acumulación nuclear de las proteínas

(Figuras 1A-R y Figuras 11A-E). Los presentes inventores mostraron que después de una estimulación de las células con estimuladores tales como VOOH, TPA y EGF, la región reguladora se somete a una fosforilación y la proteína fijada se transloca al núcleo (Figuras 2A-X; Figuras 4A-B; y Figuras 5A-F).

5 Además de poner en práctica la presente invención, los presentes inventores mostraron que esta región reguladora puede estar ligada a polipéptidos heterólogos, tales como la proteína verde fluorescente (GFP), para inducir su translocación al núcleo (Figuras 8AH y Figura 9A), lo que demuestra la generalidad y la función autónoma de esta región reguladora. Además, los presentes inventores mostraron que la mutación de los residuos de serina de esta región a residuos fosfomiméticos, inducía un nivel aún mayor de translocación al núcleo (Figura 6; Figuras 7A-H; Figuras 8A-H y Figuras 9A-B) tanto de las secuencias de polipéptidos ligadas de forma natural como sintética.

10 Además, los presentes inventores han mostrado que la región reguladora identificada anteriormente se comporta de forma autónoma y puede competir con señales endógenas (Figuras 10M-X).

Además, los presentes inventores han demostrado que después de la fosforilación de la región reguladora, la proteína fijada se asocia con la importina-7 y se transloca en el núcleo (Figuras 18A-G y 19A-C).

15 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, se proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 19 aminoácidos de longitud, comprendiendo la secuencia de aminoácidos:

$$X_1 X_2 X_3 \text{ (SEQ ID NO: 1);}$$

en donde X_1 y X_3 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico;

en donde X_2 es prolina,

20 comprendiendo el péptido aislado una actividad dirigida al núcleo.

Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "actividad dirigida al núcleo" se refiere a la capacidad del péptido para aumentar su relación de localización nuclear:citoplásmica, o de un agente ligado al mismo, en al menos un 10%, más preferiblemente en al menos un 20% e incluso más preferiblemente en al menos un 30%, 50%, 80% o más.

25 Como se ha mencionado anteriormente, el péptido aislado de la presente invención puede tener cualquier cantidad de aminoácidos entre 3 y 20. Los péptidos aislados ejemplares de la presente invención se indican en SEQ ID NO: 3.

30 La actividad dirigida al núcleo se puede detectar por medios directos o indirectos: una observación directa mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser confocal es posible cuando el péptido dirigido al núcleo está marcado con un colorante fluorescente (los kits para el etiquetado están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Pierce o Molecular Probes). La actividad dirigida al núcleo también se puede evaluar mediante microscopía electrónica, si el péptido dirigido al núcleo está marcado con un material denso en electrones tal como oro coloidal (Oliver, Methods Mol. Biol. 115 (1999), 341-345).

Se apreciará que si el péptido dirigido al núcleo está ligado a un agente heterólogo (por ejemplo, un polinucleótido), entonces la actividad se puede detectar mediante una observación de la localización del agente heterólogo.

35 La actividad dirigida al núcleo se puede evaluar de forma indirecta si la molécula ligada (por ejemplo, ácido nucleico) ejerce una función en el núcleo. Esta función puede ser, por ejemplo, la expresión de un gen codificado por el ácido nucleico ligado, incluyendo las consecuencias de tal expresión génica que se pueden ejercer sobre otras moléculas o procesos celulares.

40 Sin desear estar ligado a una teoría, los presentes inventores creen que un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de serina/treonina, prolina, serina/treonina (S/T-P-S/T) es una diana para la fosforilación, lo que da lugar a una incorporación de cargas negativas en un dominio que de otro modo no está cargado, el cual a su vez actúa como una señal para permitir que el péptido cruce la membrana nuclear.

45 Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, cuando el péptido comprende serina o treonina en el lugar de X_1 o X_3 , la actividad dirigida al núcleo es regulable. Por el contrario, cuando el péptido comprende residuos fosfomiméticos tales como ácido aspártico o ácido glutámico en el lugar de X_1 o X_3 , la actividad dirigida al núcleo es normalmente constitutiva. Se apreciará que el péptido de la presente invención puede comprender también una serina o una treonina como X_1 y un ácido aspártico o un ácido glutámico como X_3 , o viceversa. En un caso de este tipo, la localización del péptido de acuerdo con esta realización puede ser solo parcialmente regulable.

50 El término "péptido" o "polipéptido" tal como se utiliza en este documento, se refiere a un polímero de aminoácidos naturales o sintéticos, que incluye péptidos naturales (ya sean productos de degradación, polipéptidos sintetizados de forma sintética o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (por lo general, péptidos sintetizados de forma sintética), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptidos que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean aún más estables, en un organismo o más capaces de penetrar en

las células.

5 Tales modificaciones incluyen, una modificación en el extremo N terminal, una modificación en el extremo C terminal, una modificación de un enlace polipéptido, incluyendo, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la estructura principal y una modificación de un residuo. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Más detalles a este respecto se proporcionan a continuación.

10 Los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido se pueden sustituir, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces de tipo éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces de cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retro amida (-NH-CO-), derivados de polipéptidos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", naturalmente, presentada sobre el átomo de carbono.

15 Estas modificaciones pueden tener lugar en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, se pueden sustituir por un aminoácido no natural sintético, tal como fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados de Phe metilados en el anillo, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

20 Además de lo anterior, los polipéptidos de la presente invención pueden incluir también uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc.).

25 Tal como se utiliza en la memoria descriptiva de este documento y en la sección de reivindicaciones a continuación, el término "aminoácido" o "aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos de origen natural; aquellos aminoácidos que se modifican frecuentemente después de la traducción *in vivo*, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos poco habituales que incluyen ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto aminoácidos D como L (estereoisómeros).

Las Tablas 1 y 2 a continuación presentan una lista de los aminoácidos de origen natural (Tabla 1) y los aminoácidos no convencionales o modificados (Tabla 2) que se pueden utilizar en la presente invención.

30 *Tabla 1*

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
alanina	Ala	A
arginina	Arg	R
asparagina	Asn	N
ácido aspártico	Asp	D
cisteína	Cys	C
glutamina	Gln	Q
ácido glutámico	Glu	E
glicina	Gly	G
histidina	His	H
isoleucina	Ile	I
leucina	Leu	L
lisina	Lys	K
metionina	Met	M
fenilalanina	Phe	F
prolina	Pro	P
serina	Ser	S
treonina	Thr	T

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
triptófano	Trp	W
tirosina	Tyr	Y
valina	Val	V
Cualquier aminoácido como los anteriores	Xaa	X

Tabla 2

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
carboxilato de aminociclopropano	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
		ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
carboxilato de aminonorbornilo	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgin
		ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
D-arginina	Darg	L-N-metilisina	Nmlys
ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnlc
D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorvalina	Nmnva
ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmorn
D-histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
D-lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-metionina	Dmet	L-N-metiltriptófano	Nmtrp
D-ornitina	Dorn	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-serina	Dser	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	α -metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	α -metil- γ -aminobutirato	Mgab
D- α -metilalanina	Dmala	α -etilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metil- α -naftilalanina	Manap
D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu

ES 2 662 036 T3

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D- α -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
D- α -metilisoleucina	Dmile	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
D- α -metilleucina	Dmleu	α -naftilalanina	Anap
D- α -metilisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
D- α -metilornitina	Dmorn	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metiltriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metiltirosina	Dmty	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D- α -metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D- α -metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D- α -metilasparagina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D- α -metilasparatato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
D- α -metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
D-N-metilisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metiltriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nva
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metil-naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomo fenilalanina	Mhphe

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
D-N-metilglutamina	DnmglN	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietyl)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietyl)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletíl)glicina	Nhis
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indoliletíl)glicina	Nhtrp
D-N-metilisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletíl)glicina	Nval
D-N-metilrosina	Dnmtyr	N-metilanaftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletíl-glicina	Metg
L- α -metilglutamina	MglN	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -etilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metilisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -etilvalina	Mtrp	L- α -metiltirosina	Mtyr
L- α -metilleucina	Mval nbhm	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
N-(N-(2,2-difeniletíl) carbamilmetil-glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil) carbamilmetil(1)glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difenilhamino)ciclopropano	Nmbc		

Los péptidos de la presente invención pueden comprender secuencias líder para modular su secreción en la célula. Una secuencia líder ejemplar puede comprender ácido mirístico o la secuencia líder TAT como se indica en SEQ ID NO: 27.

- 5 Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar bioquímicamente, tal como mediante el uso de técnicas

convencionales en fase sólida. Estos métodos incluyen métodos de síntesis en fase sólida exclusivos, métodos de síntesis en fase sólida parciales, de condensación de fragmentos, de síntesis en solución clásica. Estos métodos se utilizan preferentemente cuando el péptido es relativamente corto (es decir, 10 kDa) y/o cuando no se puede producir por técnicas recombinantes (es decir, no están codificados por una secuencia de ácido nucleico) y por lo tanto eso implica una técnica química diferente.

Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y están descritos adicionalmente por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2ª ed., Pierce Chemical Company, 1984).

Los péptidos sintéticos se pueden purificar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa [Creighton T. (1983) *Proteins, Structures and Molecular Principles*. WH Freeman and Co. NY.], y la composición de los cuales se pueden confirmar mediante una secuenciación de los aminoácidos.

Las técnicas recombinantes también se pueden usar para generar los péptidos y/o los polipéptidos de la presente invención. Estas técnicas se pueden preferir cuando el péptido está ligado a una proteína heteróloga (es decir, una proteína de fusión) ya que las técnicas recombinantes son más adecuadas para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, más de 20 aminoácidos) y grandes cantidades de los mismos. Tales técnicas recombinantes están descritas por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, sección VIII, p. 421-463. Ejemplos de proteínas heterólogas se proporcionan a continuación.

Para producir un péptido y/o un polipéptido de la presente invención utilizando la tecnología recombinante, un polinucleótido que codifica el péptido dirigido al núcleo de la presente invención, se liga en un vector de expresión de ácido nucleico que comprende la secuencia de polinucleótido bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, una secuencia promotora) adecuada para dirigir una transcripción constitutiva, específica de tejido o inducible de los polipéptidos de la presente invención en las células hospedadoras.

La expresión "un polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico monocatenario o bicatenario, que se aísla y se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementario (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómico y/o secuencias de polinucleótidos compuestas (por ejemplo, una combinación de las anteriores).

Tal y como se emplea en este documento, la expresión "secuencia de polinucleótido complementario" se refiere a una secuencia, que es el resultado de una transcripción inversa del ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra polimerasa de ADN dependiente de ARN. Una secuencia de este tipo se puede amplificar posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

Tal y como se emplea en este documento, la expresión "secuencia de polinucleótido genómico" se refiere a una secuencia obtenida (aislada) a partir de un cromosoma y por lo tanto representa una porción contigua de un cromosoma.

Tal y como se emplea en este documento, la expresión "secuencia de polinucleótidos compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias de exones requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias de intrones intercaladas entre ellas. Las secuencias intrónicas pueden proceder de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y normalmente incluirán secuencias de señales de corte y empalme conservadas. Tales secuencias intrónicas pueden incluir además elementos reguladores de la expresión que actúan en cis.

Como se ha mencionado anteriormente, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención se insertan en vectores de expresión (es decir, una estructura artificial de ácido nucleico) para permitir una expresión del péptido recombinante. El vector de expresión de la presente invención puede incluir secuencias adicionales que hacen que ese vector sea adecuado para una replicación e integración en procariontes, eucariotes o preferiblemente en ambos (por ejemplo, vectores transportadores). Los vectores de clonación típicos contienen secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación). Se apreciará que el vector de expresión puede comprender también secuencias de polinucleótidos que codifican otros polipéptidos que están ligados transcripcionalmente a los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención. Tales polipéptidos se describen adicionalmente en este documento a continuación.

Una variedad de células procariontes o eucariotes se puede utilizar como sistemas de expresión en hospedadores para expresar los péptidos de la presente invención. Estas incluyen microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contiene la secuencia que codifica el polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia que codifica el polipéptido; sistemas de células vegetales

infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, tales como el plásmido Ti, que contiene la secuencia que codifica el polipéptido.

5 Se apreciará que los polinucleótidos de la presente invención también se pueden expresar directamente en el sujeto (es decir, terapia génica *in vivo*) o se pueden expresar *ex vivo* en un sistema celular (autólogo o no autólogo) y luego se administran al sujeto. Las técnicas de terapia génica se describen adicionalmente a continuación.

10 Además de contener los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia que codifica insertada (que codifica el polipéptido), la estructura artificial de expresión de la presente invención también puede incluir secuencias modificadas genéticamente para optimizar la estabilidad, la producción, la purificación, el rendimiento o la actividad del péptido expresado.

15 Se pueden emplear diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema de la célula hospedadora. Tales métodos se describen en general en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, una transfección estable o transitoria, una lipofección, una electroporación e infección con vectores víricos recombinantes. Además, véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positivos-negativos.

20 Las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permitan la expresión de grandes cantidades de polipéptido recombinante. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen condiciones de medios eficaces, de biorreactor, de temperatura, de pH y de oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. Un medio de este tipo incluye normalmente una solución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato y sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células de la presente invención se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, un pH y un contenido en oxígeno que sean apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la pericia de un experto ordinario en la técnica.

25 30 Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado para la producción, los péptidos y/o polipéptidos resultantes de la presente invención pueden o bien permanecer dentro de la célula recombinante, ser secretados al medio de fermentación, secretados a un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*; o ser retenidos en la superficie externa de una membrana celular o vírica.

35 Después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación del péptido y/o del polipéptido recombinante.

La expresión "recuperación del polipéptido recombinante" empleada en este documento, se refiere a la recogida de todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no implica necesariamente etapas adicionales de separación o purificación.

40 Por lo tanto, los péptidos y/o los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar usando una variedad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía por interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concavalina A, cromatografía y solubilización diferencial.

45 Para facilitar la recuperación, la secuencia codificadora expresada se puede diseñar para codificar el polipéptido de la presente invención y el resto escindible fusionado. Una proteína de fusión de este tipo se puede diseñar de manera que el polipéptido se pueda aislar fácilmente mediante cromatografía por afinidad; por ejemplo, mediante una inmovilización sobre una columna específica del resto escindible. Cuando un sitio de escisión se modifica genéticamente entre el polipéptido y el resto escindible, el polipéptido se puede liberar desde la columna cromatográfica mediante un tratamiento con una enzima o agente adecuado que escinde específicamente la proteína de fusión en ese sitio [por ejemplo, véase Booth et al., *Immunol. Lett.* 19: 65-70 (1988); y Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265: 15854-15859 (1990)].

50 Los péptidos y/o los polipéptidos de la presente invención se recuperan preferiblemente en forma "sustancialmente pura".

Tal y como se emplea en este documento, la expresión, la expresión "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en este documento.

55 Además de ser sintetizable en las células hospedadoras, el péptido y/o el polipéptido de la presente invención se pueden sintetizar también utilizando sistemas de expresión *in vitro*. Estos métodos son bien conocidos en la técnica

y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los polinucleótidos de la presente invención también se pueden administrar directamente a un sujeto, en donde se traducen en las células diana, es decir, terapia génica.

5 La terapia génica tal como se utiliza en este documento, se refiere a la transferencia de material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés a un hospedador para tratar o prevenir una enfermedad genética o adquirida o una afección o un fenotipo. El material genético de interés codifica un producto (por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un péptido, un ARN funcional, antisentido) cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, un receptor, una enzima, un polipéptido o un péptido de valor terapéutico. Para una revisión, véase, en general, el texto "Gene Therapy" (Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997).

15 Se han desarrollado dos enfoques básicos para la terapia génica: (1) terapia génica *ex vivo* y (2) terapia génica *in vivo*. En la terapia génica *ex vivo*, las células se retiran de un paciente y mientras que se están cultivando son tratadas *in vitro*. Generalmente, un gen de sustitución funcional se introduce en la célula a través de un vehículo/método de entrega de genes apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión, según sea necesario y después las células modificadas se multiplican en cultivo y se devuelven al hospedador/paciente. Estas células reimplantadas genéticamente han mostrado que expresan el material genético transfectado *in situ*. Las células pueden ser autólogas o no autólogas para el sujeto. Dado que las células no autólogas es probable que induzcan una reacción inmune cuando se administran en el cuerpo, se han desarrollado varios enfoques para reducir la probabilidad de rechazo de las células no autólogas. Estos incluyen la supresión del sistema inmune del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas inmunoaislantes, semipermeables antes del trasplante.

20 En la terapia génica *in vivo*, las células diana no se retiran del sujeto, más bien el material genético que se va a transferir es introducido en las células del organismo receptor *in situ*, es decir, dentro del receptor. En una realización alternativa, si el gen del hospedador es defectuoso, el gen se repara *in situ* (Culver, 1998. (Abstract) Antisense ADN & RNA based therapeutics, February 1998, Coronado, CA).

Estas células alteradas genéticamente han mostrado que expresan el material genético transfectado *in situ*.

30 Para conferir una especificidad, preferiblemente las estructuras artificiales de ácido nucleico usadas para expresar los péptidos y/o los polipéptidos de la presente invención, comprenden elementos de una secuencia promotora específica de las células, tales como promotores específicos del cáncer (por ejemplo, el promotor survivina - Chen et al., Cancer Gene Therapy 2004, volumen 11, número 11, páginas 740-747).

35 Para la terapia génica, los ácidos nucleicos se introducen normalmente en las células mediante una infección con agentes víricos. Esto se debe a que se puede obtener una eficacia mejor debido a su naturaleza infecciosa. Por otra parte, los virus están muy especializados y normalmente infectan y se propagan en tipos celulares específicos. Por lo tanto, su especificidad natural se puede utilizar para dirigir los vectores hacia tipos de células específicas *in vivo* o dentro de un tejido o un cultivo mixto de células. Los vectores víricos también se pueden modificar con receptores o ligandos específicos para alterar la especificidad de la diana a través de eventos mediados por receptores.

40 Además, los vectores víricos recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de un ácido nucleico deseado, debido a que ofrecen ventajas tales como una infección lateral y especificidad para dirigir hacia una diana. La infección lateral es inherente en el ciclo de vida, por ejemplo, del retrovirus y es el proceso mediante el cual una única célula infectada produce muchos viriones descendientes que se desprenden e infectan las células vecinas. El resultado es que un área grande se infecta rápidamente, la mayoría de la cual no se había infectado inicialmente con las partículas víricas originales. Esto está en contraposición con la infección de tipo vertical en la que el agente infeccioso se extiende solo a través de la progenie hija. Los vectores víricos también se pueden producir de modo que sean incapaces de propagarse lateralmente. Esta característica puede ser útil si el objetivo deseado es introducir un gen especificado solo en una cantidad localizada de células diana.

Como se ha mencionado anteriormente en este documento, los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención se pueden usar para modular la translocación al núcleo de polipéptidos endógenos y exógenos en células hospedadoras, incluyendo células en división (por ejemplo, líneas celulares) y células que no se dividen (por ejemplo, células primarias) y células eucariotas tales como células de mamífero y células de levadura.

50 Por ejemplo, los presentes inventores han mostrado que los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención se comportan de forma autónoma y compiten con señales endógenas, tales como las comprendidas en ERK. Esto se traduce en una regulación a la baja de la translocación al núcleo de tales señales endógenas.

Los péptidos ejemplares que son capaces de regular a la baja polipéptidos endógenos, comprenden la secuencia de aminoácidos que es al menos 70% homóloga a una secuencia como se indica por:

55 L D Q L N H I L G I L G X₁ P X₂ Q E D (SEQ ID NO: 4);

en donde X_1 y X_2 son cualquier aminoácido.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "ERK" se refiere al polipéptido "cinasa regulada por una señal extracelular" que se transloca al núcleo después de una estimulación celular.

5 Los presentes inventores han mostrado que, con el fin de evitar la translocación al núcleo de ERK, preferiblemente X_1 y X_2 son aminoácidos que no se pueden fosforilar. Por consiguiente, preferiblemente los aminoácidos no comprenden serina, treonina, ácido aspártico o ácido glutámico. De acuerdo con una realización, el péptido aislado de este aspecto de la presente invención es como se expone en SEQ ID NO: 5.

10 Se apreciará que los péptidos de la presente invención también pueden ser capaces de evitar una translocación al núcleo de otros polipéptidos que comprenden endógenamente los péptidos señal actualmente identificados y de regular a la baja sus actividades nucleares en las células hospedadoras. Ejemplos de polipéptidos que comprenden endógenamente los péptidos señal identificados de la presente invención incluyen, MEK SMAD, AKT y BRCA.

15 Dado que los péptidos de la presente invención son capaces de inhibir específicamente las actividades nucleares de ERK sin modular sus actividades citoplasmáticas, estos péptidos se pueden utilizar para inhibir las actividades nucleares de ERK (por ejemplo, la proliferación) sin dañar otras actividades citoplasmáticas relacionadas con ERK en las células. Por lo tanto, los péptidos de este aspecto de la presente invención pueden servir como un agente terapéutico para enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer, sin tener los efectos secundarios de otros inhibidores de ERK.

20 Como se ha mencionado, los presentes inventores han mostrado que después de la fosforilación de los polipéptidos identificados anteriormente en sus sitios de fosforilación dianas (S/T-P-S/T), estos polipéptidos se asocian con la importina-7 y luego se translocan al núcleo.

Se apreciará por lo tanto que la disminución de la actividad o la cantidad de importina-7 en una célula podría regular a la baja la cantidad de estos polipéptidos que se está translocando al núcleo. De este modo, agentes capaces de regular a la baja la actividad o la cantidad de importina-7, también se contemplan como un agente terapéutico para enfermedades hiperproliferativas.

25 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido para uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa tal como el cáncer en un sujeto.

Tal y como se usa en este documento, el término "tratar" se refiere a la prevención, alivio o disminución de un síntoma asociado con una enfermedad hiperproliferativa. Preferiblemente, el tratamiento cura, por ejemplo, elimina sustancialmente, los síntomas asociados con la enfermedad hiperproliferativa.

30 Las afecciones hiperproliferativas que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención, son cáncer de cerebro, de piel (tal como melanoma), de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, de cuello, esofágico, de próstata, colorrectal, de pulmón, renal, ginecológico (tal como de ovario) o de tiroides; otros epitelomas; quistes en diversos órganos; verrugas y tumores de tipo verruga inducidos por una infección vírica; fibrosarcoma y sus metástasis. En otra realización, la presente invención se refiere al tratamiento de un trastorno hiperproliferativo no canceroso, tal como una hiperplasia benigna de la piel o de la próstata (por ejemplo, hipertrofia prostática benigna), hiperplasia sinovial en artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, reestenosis, aterosclerosis, trombosis, esclerodermia o fibrosis.

35 De acuerdo con una realización de este aspecto de la presente invención, el agente usado para tratar trastornos hiperproliferativos es un agente peptídico, tal como se expone en SEQ ID NO: 5.

40 De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente invención, el agente usado para tratar trastornos hiperproliferativos es un agente capaz de regular a la baja una actividad y/o una cantidad de importina-7.

Tal como se utiliza en este documento, el término "importina-7" se refiere al polipéptido importina-7 de mamífero (por ejemplo, de ser humano) capaz de pasar a través del poro nuclear y que está involucrado en el transporte nuclear. Una secuencia ejemplar del polipéptido de importina-7 se indica en NP_006382.

45 Los agentes capaces de regular a la baja la importina-7 pueden ser agentes de ácido nucleico, tales como ARNsi, ARNzimas, ADNzimas o polinucleótidos antisentido.

50 El término "ARNsi" tal como se usa en el presente documento, se refiere a ARNs de interferencia pequeños que también incluyen ARN de horquilla corta (ARNhc) [Paddison et al., Genes & Dev. 16: 948-958, 2002], que son capaces de causar una interferencia y pueden causar un silenciamiento post-transcripcional de genes específicos en células, por ejemplo, células de mamífero (incluyendo células humanas) y en el cuerpo, por ejemplo, cuerpos de mamíferos (incluyendo seres humanos).

La interferencia del ARN es un proceso de dos etapas. En la primera etapa, que se denomina la etapa de iniciación, el ARNs de entrada se digiere en ARNs de interferencia pequeños de 21-23 nucleótidos (nt) (ARNsi), probablemente por la acción de Dicer, un miembro de la familia ARNasa III de las ribonucleasas específicas de

ARNds, que procesa (escinde) el ARNds (introducido directamente o por medio de un transgén o un virus) de una manera dependiente de ATP. Eventos de escisión sucesivos degradan el ARN a dúplex de 19-21 pb (ARNsi), cada uno con extremos sobresalientes en 3' de 2 nucleótidos [Hutvagner y Zamore, *Curr Opin Genetics and Development* 12: 225-232 (2002); y Bernstein, *Nature* 409: 363-366 (2001)].

- 5 En la etapa efectora, los dúplex de ARNsi se unen a un complejo de nucleasa procedente del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Se requiere que los dúplex de ARNsi se desenrollen de forma dependiente de ATP para la activación del RISC. El RISC activo, se dirige entonces al transcrito homólogo mediante interacciones de apareamiento de bases y escinde el ARNm en fragmentos de 12 nucleótidos desde el extremo 3' del ARNsi [Hutvagner y Zamore, *Curr Op Gen Develop.* 12: 225-232 (2002); Hammond et al., 2001. *Nat Rev Gen.* 2: 110-119 (2001); y Sharp *Genes Dev.* 15: 485-90 (2001)]. Aunque el mecanismo de escisión todavía no se ha dilucidado, la investigación indica que cada RISC contiene un único ARNsi y una ARNasa [Hutvagner y Zamore, *Curr Opin Gen. Develop.* 12: 225-232 (2002)].

- 15 Debido a la notable potencia del ARNi, se ha sugerido una etapa de amplificación dentro de la vía del ARNi. La amplificación podría tener lugar mediante una copia de los ARNds de entrada que generarían más ARNsi, o por replicación de los ARNsi formados. Alternativa o adicionalmente, la amplificación se podría efectuar mediante múltiples eventos de renovación del RISC [Hammond et al., *Nat Rev Gen.* 2: 110-119 (2001), Sharp *Genes Dev.* 15: 485-90 (2001); Hutvagner y Zamore, *Curr Opin Gen. Develop.* 12: 225-232 (2002)]. Una amplia orientación para el uso del ARNi para poner en práctica la presente invención, se proporciona en publicaciones de la técnica [véase, por ejemplo: Tuschl, *ChemBiochem.* 2: 239-245 (2001); Cullen, *Nat Immunol.* 3: 597-599 (2002); y Brantl, *Biochem Biophys Acta* 1575: 15-25 (2002)].

- 25 La síntesis de moléculas de ARNi adecuadas para uso en la presente invención se puede efectuar del modo siguiente. En primer lugar, la secuencia de ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención se escanea aguas abajo del codón de inicio AUG, en busca de secuencias de dinucleótidos AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3', se registra como posibles sitios diana de ARNsi. Preferiblemente, los sitios diana de ARNsi se seleccionan a partir del marco de lectura abierto, como regiones no traducidas (UTRs), estando enriquecidos en los sitios de unión a proteínas reguladoras. Las proteínas que se unen a UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de ARNsi endonucleasa [Tuschl, *Chem Biochem.* 2: 239-245]. Se apreciará sin embargo, que los ARNsi dirigidos a las regiones no traducidas, también pueden ser eficaces, como se ha demostrado para GAPDH, en donde el ARNsi dirigido a la UTR 5' mediaba aproximadamente en un 90% de la disminución del ARNm de GAPDH celular y suprimía completamente el nivel de proteínas (<http://www.ambion.com/techlib/tn/142/3.html> o <http://www.ambion.com/techlib/tn/131/4.html>).

- 35 En segundo lugar, los posibles sitios diana se comparan con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, de ser humano, ratón, rata, etc.) empleando cualquier programa informático de alineación de secuencias, tal como el programa informático BLAST disponible en el servidor del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Los sitios diana putativos que muestran una homología significativa con otras secuencias codificantes, se ignoran.

- 40 Las secuencias diana que cumplen los requisitos se seleccionan como molde para la síntesis de ARNsi. Las secuencias preferidas son las que incluyen un contenido bajo en G/C, ya que han demostrado ser más eficaces en la mediación del silenciamiento de genes, en comparación con las que tienen un contenido en G/C superior al 55%. Diversos sitios diana se seleccionan preferiblemente a lo largo de la longitud del gen diana para una evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNsi seleccionados, se utiliza conjuntamente preferiblemente un control negativo. Los ARNsi como controles negativos incluyen preferiblemente la misma composición de nucleótidos que los ARNsi pero carecen de una homología significativa con el genoma. Por lo tanto, se utiliza preferentemente una secuencia de nucleótidos desordenados del ARNsi, con la condición de que no muestre ninguna homología significativa con ningún otro gen.

- 45 Los ARNsi ejemplares capaces de una regulación a la baja de la importina-7 de mamífero se indican en SEQ ID NOs: 28-32. Otro ARNsi ejemplar capaz de una regulación a la baja de la importina-7 de mamífero se da a conocer en Saijou et al. [*J. Biol. Chem.*, vol. 282, número 44, 32327-32337, 2 de noviembre de 2007].

Otro agente capaz de inhibir la importina-7 es un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm de importina-7.

- 50 El diseño de moléculas antisentido que se pueden usar para regular a la baja de manera eficaz la proteína de salida del sistema, se debe llevar a cabo teniendo en cuenta dos aspectos importantes para el enfoque antisentido. El primer aspecto es la entrega del oligonucleótido en el citoplasma de las células apropiadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se une específicamente al ARNm designado dentro de las células, de una manera que inhibe la traducción del mismo.

- 55 La técnica anterior describe una serie de estrategias de entrega que se pueden utilizar para entregar eficazmente los oligonucleótidos a una amplia variedad de tipos de células [véase, por ejemplo, Luft *J Mol Med* 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al. *Blood* 91: 852-62 (1998); Rajur et al. *Bioconjug Chem* 8: 935-40 (1997); Lavigne et al. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71 (1997) y Aoki et al. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 231: 540-5 (1997)].

Además, los algoritmos para la identificación de las secuencias con la mayor afinidad de unión prevista hacia su ARNm diana, basados en un ciclo termodinámico que da cuenta de la energía de las alteraciones estructurales tanto en el ARNm diana como en el oligonucleótido, también están disponibles [véase, por ejemplo, Walton et al. *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9 (1999)].

- 5 Tales algoritmos se han utilizado con éxito para poner en práctica un enfoque de tipo antisentido en las células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton et al., permitió que los científicos diseñaran con éxito oligonucleótidos antisentido para los transcritos de beta-globina de conejo (RBG) y de factor de necrosis tumoral alfa de ratón (TNF alfa). El mismo grupo de investigadores ha indicado más recientemente que la actividad antisentido de oligonucleótidos seleccionados racionalmente contra tres ARNm diana modelos (lactato deshidrogenasa humana A y B y gp130 rata) en cultivo celular, tal y como se evaluó mediante una técnica de PCR cinética, demostró ser eficaz en casi todos los casos, incluyendo pruebas contra tres dianas diferentes en dos tipos de células con métodos químicos de oligonucleótidos de tipo fosfodiéster y fosforotioato.

Además, también se publicaron varios enfoques para el diseño y la predicción de la eficacia de oligonucleótidos específicos utilizando un sistema *in vitro* (Matveeva et al., *Nature Biotechnology* 16: 1374-1375 (1998)).

- 15 El consenso actual es que los desarrollos recientes en el campo de la tecnología de tipo antisentido que, como se ha descrito anteriormente, han dado lugar a la generación de algoritmos de diseño de tipo antisentido altamente precisos y una amplia variedad de sistemas de entrega de oligonucleótidos, permiten a un experto en la técnica diseñar e implementar enfoques de tipo antisentido adecuados para regular a la baja la expresión de secuencias conocidas sin tener que recurrir a una experimentación indebida mediante ensayo y error.

- 20 Otro agente capaz de regular a la baja la importina-7 es una molécula de ribozima. Las ribozimas están siendo utilizadas cada vez más para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de los ARNm que codifican proteínas de interés [Welch et al., *Curr Opin Biotechnol*. 9: 486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico, las ha convertido en una herramienta valiosa en la investigación básica y las aplicaciones terapéuticas. En el área de la terapéutica, las ribozimas se han explotado para dirigirse a ARN víricos en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos [Welch et al., *Clin Diagn Virol*. 10: 163-71 (1998)]. En particular, varios protocolos de terapia génica con ribozimas para pacientes con VIH, ya están en la fase 1 de los ensayos. Más recientemente, las ribozimas se han utilizado para la investigación animal transgénica, la validación de dianas génicas y la elucidación de rutas. Varias ribozimas están en distintas fases de ensayos clínicos. ANGIOZYME fue la primera ribozima sintetizada químicamente para estudiarla en ensayos clínicos humanos. ANGIOZYME inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), un componente clave en la ruta de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras empresas han demostrado la importancia de los agentes terapéuticos anti-angiogénesis en modelos animales. HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el ARN del virus de la hepatitis C (VHC), se mostró que era eficaz para disminuir el ARN vírico de la hepatitis C en ensayos en cultivos celulares (página de inicio de la WEB de Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated).

Al igual que los agentes de ácido nucleico, la presente invención también contempla el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos contra la importina-7, para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos.

- 40 De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo de la importina-7. Tal como se utiliza en este documento, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico sobre un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de la superficie químicamente activas tales como cadenas laterales de aminoácidos o carbohidrato y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

- 45 El término "anticuerpo", tal como se usa en esta invención, incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv que son capaces de unirse a los macrófagos. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen del modo siguiente: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente que se une a antígeno de una molécula de anticuerpo, puede ser producido mediante digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína, para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de una reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin una reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos con dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (5) anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado, tal como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

5 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. A estos residuos de aminoácidos no humanos se hace referencia frecuentemente como residuos de importación, que se toman normalmente a partir de un dominio variable de importación. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)],
10 mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDRs de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (documento de Patente de EE.UU. n° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDRs y posiblemente algunos residuos de FRs se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo las genotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86 -95 (1991)]. De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la estimulación, se observa una producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblamiento y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE.UU. n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

30 Otro agente capaz de regular a la baja una función de la importina-7, es un agente peptídico capaz de interferir con la unión de importina-7 al polipéptido de ERK. Puesto que se había mostrado que la importina-7 interacciona con el sitio diana fosforilado "SPS", el péptido capaz regular a la baja una función de la importina-7 puede comprender estos aminoácidos con el fin de competir con los aminoácidos "SPS" endógenos en ERK.

La presente invención también prevé la prevención de la translocación al núcleo de polipéptidos que comprenden endógenamente los péptidos señal actualmente identificados, mediante una mutación de las secuencias identificadas de la presente invención, mediante el uso de estrategias de introducción de genes (del inglés, "knock-in").

Otro medio para modular la translocación al núcleo de polipéptidos endógenos es mediante la interacción proteína/proteína. Por tanto, por ejemplo, un péptido que se dirige al núcleo unido a un anticuerpo, se puede introducir en una célula. El anticuerpo reconoce y se une a su polipéptido diana de modo que el polipéptido diana se fija indirectamente al péptido que se dirige al núcleo.

Se apreciará que, además de funcionar para modular la translocación de polipéptidos endógenos, los péptidos de la presente invención pueden estar ligados a una sustancia heteróloga a través de un enlazador, actuando de este modo como vehículos, transportando la sustancia heteróloga al núcleo de una célula. Se apreciará que el péptido que se dirige al núcleo de la presente invención también se puede fijar a una sustancia heteróloga en la célula y no *in vitro*. Por tanto, la sustancia heteróloga se puede administrar a la célula, ya sea antes, junto con o después de la administración del péptido que se dirige al núcleo.

La sustancia heteróloga puede ser cualquier material cuya actividad de dirigir al núcleo se pueda desear, por ejemplo un agente farmacéutico tal como un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un agente cosmético. Por lo tanto, según este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga puede ser un polipéptido, un polinucleótido, un lípido, un hidrato de carbono, una hormona, un esteroide, un compuesto químico pequeño, un virus y cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con una realización de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es un polipéptido. El polipéptido puede ser, por ejemplo, una proteína de inmortalización (por ejemplo, el antígeno T grande de SV40 y la telomerasa), una proteína anti-apoptótica (por ejemplo, p53 mutante y Bcl.sub.xL), un anticuerpo, un oncogén (por ejemplo, ras, myc, HPV E6/E7 y E1a de adenovirus), una proteína reguladora del ciclo celular (por ejemplo, ciclina y cinasa dependiente de ciclina) o una enzima (por ejemplo, proteína fluorescente verde, beta-galactosidasa y cloranfenicol acetil transferasa).

De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es un ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ARN, ADN o ADNc. La secuencia del ácido nucleico puede ser una secuencia codificadora o no codificadora (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido).

5 La capacidad para transferir de forma segura y eficaz los ácidos nucleicos a las células es un objetivo fundamental en la biotecnología. Los sistemas de entrega sintéticos actuales, aunque son seguros, son relativamente ineficaces. Uno de los principales obstáculos para entregar el gen de forma eficaz es dirigir el material genético al núcleo. En los métodos de entrega de genes actuales, el movimiento del ADN a través del citosol hacia el núcleo se produce a través de difusión, un proceso relativamente lento durante el cual el material genético se expone a un entorno citoplásmico degradante. Regular al alza la eficacia de la translocación al núcleo de los ácidos nucleicos mediante la
10 incorporación de péptidos que se dirigen al núcleo, ya se ha logrado - véase, por ejemplo, Zanta et al., PNAS, vol. 96, nº 1, 91-96, 5 de enero de 1999; Subramanian, A. et al., (1999) Nat. Biotechnol. 17: 873-877.

Por tanto, los presentes inventores prevén que los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención aumentarán la eficacia de varios protocolos de transfección, incluyendo la microinyección, la electroporación, la coprecipitación con fosfato de calcio, la introducción con DEAE dextrano, la introducción mediada por liposomas, la
15 introducción mediada por virus, la inyección de ADN desnudo y el bombardeo biolístico.

De acuerdo con todavía otra realización de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es un virus. El virus puede ser un virus completo o un núcleo de virus que contiene ácido nucleico vírico (es decir, ácido nucleico vírico empaquetado en ausencia de una envuelta vírica). Ejemplos de virus y núcleos de virus que pueden ser transportados, incluyen el virus del papiloma, adenovirus, baculovirus, núcleo de retrovirus y núcleo de virus Semliki.
20

De acuerdo con todavía otra realización de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, un radionúclido, un marcador fluorescente o un tinte.

De acuerdo con una realización adicional de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es un sistema de administración de fármacos tal como, por ejemplo, partículas magnéticas, perlas de sílice, PLGA, nano o microesferas, quitosano, etc.
25

De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es un resto con afinidad, tal como un anticuerpo, un ligando de receptor o un hidrato de carbono. La unión de restos con afinidad a los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención es particularmente beneficiosa cuando es deseable dirigirse a un tipo de célula particular con el péptido que se dirige al núcleo. Ejemplos de anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la presente invención, incluyen anticuerpos tumorales, anticuerpos anti CD20 y anticuerpos anti-IL 2R alfa. Receptores a modo de ejemplo incluyen receptores de folato y receptores de EGF. Un hidrato de carbono a modo de ejemplo que se puede emplear de acuerdo con este aspecto de la presente invención, es la lectina.
30

De acuerdo con todavía otra realización de este aspecto de la presente invención, la sustancia heteróloga es un resto detectable.
35

El resto detectable se puede detectar directamente, normalmente en virtud de su emisión de radiación con una longitud de onda particular (por ejemplo, un agente fluorescente, un agente fosforescente o un agente quimioluminiscente). Alternativamente, el resto detectable puede no ser directamente detectable. Por ejemplo, el resto de agente detectable puede ser un sustrato para una reacción enzimática que es capaz de generar un producto detectable.
40

Se apreciará que los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención pueden estar ligados a más de una sustancia heteróloga, ya sea directa y/o indirectamente.

La sustancia heteróloga puede estar ligada al péptido que se dirige al núcleo de la presente invención a través de cualquier método conocido en la técnica y que sea adecuado para esa sustancia heteróloga particular. Por tanto, por ejemplo, si la sustancia heteróloga es un polipéptido, el enlazador puede comprender un enlace peptídico o un enlace peptídico sustituido, como se ha descrito anteriormente. Si la sustancia heteróloga es una molécula pequeña, el enlazador puede comprender un enlace no peptídico.
45

Ejemplos de métodos de unión incluyen la reticulación química, la fusión genética y la formación de puentes.

50 *Reticulación química:* Se puede emplear o bien un agente reticulante homobifuncional o un agente reticulante heterobifuncional para reticular un péptido que se dirige al núcleo de la presente invención con una sustancia heteróloga. El agente reticulante homobifuncional o heterobifuncional se puede escindir para facilitar la separación del péptido que se dirige al núcleo desde la sustancia heteróloga, después de que el péptido que se dirige al núcleo transporte la sustancia heteróloga a través de una membrana celular. Los agentes reticulantes homobifuncionales tienen al menos dos grupos reactivos idénticos. El uso de agentes de reticulación homobifuncionales puede dar
55 lugar a una auto-conjugación, reticulación intramolecular y/o polimerización. Los agentes reticulantes

homobifuncionales son principalmente reactivos con aminas primarias (por ejemplo, imidoésteres, ésteres de N-succinimidilo, isotiocianatos, ácidos carboxílicos y cloruros de sulfonilo) o reactivos con sulfhidrilo (por ejemplo, 2-piridilditio, 3-nitro-2-piridilditio, maleimida, vinil sulfona, haluro de arilo, dinitrofluorobenceno, organomercurial, p-cloromercuribenzoato, bismaleimidohexano, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno y 1,4-di-(3'-(2'-piridiltio)-propionamido)butano). Ejemplos de imidoésteres homobifuncionales incluyen dimetiladipimidato, dimetilsuberimidato y ditiobispropionimidato. Ejemplos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen glutarato de disuccinimidilo, suberato de bis(sulfosuccinimidilo), ditiobis(propionato de succinimidilo) y tartrato de disuccinimidilo.

Los agentes reticulantes heterobifuncionales poseen dos o más grupos reactivos diferentes que permiten una conjugación secuencial con grupos específicos, reduciendo de este modo al mínimo una polimerización indeseable o la autoconjugación. Algunos agentes reticulantes heterobifuncionales son reactivos con amina en un extremo y reactivos con sulfhidrilo en el otro extremo. Ejemplos de tales agentes reticulantes incluyen 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, éster de m-maleimidobencil-N-hidroxisuccinimida, 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo, bismaleimidohexano y éster de N-(g-maleimidobutiriloxi)succinimida.

Las reacciones de reticulación homobifuncionales o heterobifuncionales se pueden detener después de añadir mediante ligación el agente reticulante homobifuncional o heterobifuncional al péptido que se dirige al núcleo. El péptido que se dirige al núcleo con un agente reticulante homobifuncional o heterobifuncional se puede purificar por métodos bien conocidos en la técnica y se utiliza como una reserva para añadir sustancias heterólogas. Tales péptidos que se dirigen al núcleo purificados con el reactivo de reticulación homobifuncional o heterobifuncional fijado, se pueden almacenar, por ejemplo, a -20°C en partes alícuotas y posteriormente se descongelan. Una vez descongelados, se puede añadir una sustancia heteróloga completando la reacción de reticulación.

Fusión genética: Las fusiones genéticas se pueden generar mediante la unión de una secuencia que codifica un péptido que se dirige al núcleo, en marco con una secuencia que codifica una sustancia heteróloga de polipéptido. Existen muchos métodos en la técnica para unir secuencias codificadoras entre sí. Los métodos ejemplares incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR de tipo cosido y la digestión con endonucleasas de restricción y ligación. Preferiblemente, los marcos de lectura del péptido que se dirige al núcleo y la sustancia heteróloga están en marco y fusionados de forma transcripcional.

Un sitio de escisión de la proteasa se puede incluir entre el péptido que se dirige al núcleo y la sustancia heteróloga del polipéptido. Ejemplos de sitios de escisión de la proteasa de este tipo incluyen el Factor Xa y la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV).

Moléculas formadoras de puente: Los péptidos que se dirigen al núcleo y las sustancias heterólogas pueden formar complejos usando parejas de moléculas que forman puentes. Ejemplos de tales parejas incluyen (a) estreptavidina y biotina, (b) glutatión y glutatión-S-transferasa y (c) polihistidina y un reactivo de cromatografía por afinidad (por ejemplo, ácido nitrilotriacético tetradentado (NTA) o ácido iminodiacético (IDA)), que interactúan a través de un ion tal como Ni^{+2} . Un péptido que se dirige al núcleo puede estar unido a cualquier miembro de la pareja y una sustancia heteróloga está unida a la otra molécula formadora del puente. Por ejemplo, si el péptido que se dirige al núcleo está unido a la glutatión-S-transferasa, entonces la carga está unida a glutatión. Alternativamente, el péptido que se dirige al núcleo puede estar unido a estreptavidina y la sustancia heteróloga puede estar unida a biotina. El péptido que se dirige al núcleo y la estreptavidina se pueden unir mediante cualquier método conocido en la técnica para unir un péptido y una molécula formadora de puente. Ejemplos de tales métodos incluyen la reticulación química o la fusión genética. La sustancia heteróloga se une después a la biotina por cualquier método conocido en la técnica para biotinilar moléculas pequeñas, proteínas o ácidos nucleicos, tal como la reticulación química. El complejo de péptido que se dirige al núcleo/sustancia heteróloga se puede formar poniendo en contacto el péptido que se dirige al núcleo-estreptavidina con la sustancia heteróloga biotinilada.

Un péptido que se dirige al núcleo y una sustancia heteróloga pueden formar un complejo de forma química o usando parejas de moléculas formadoras de puente en cualquier posición sobre el péptido que se dirige al núcleo o la sustancia heteróloga, siempre que la funcionalidad del péptido que se dirige al núcleo o de la sustancia heteróloga no se destruya. Por ejemplo, un agente reticulante reaccionará con grupos funcionales apropiados, situados en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal (para proteínas), en el extremo 5' o 3' (para ácidos nucleicos) o a lo largo de la molécula.

Un experto en la técnica será capaz de determinar si las respectivas partes del complejo de péptido que se dirige al núcleo/sustancia heteróloga conservan la actividad biológica. El péptido que se dirige al núcleo conserva la actividad biológica si puede translocar la sustancia heteróloga unida a un núcleo celular. La actividad transportadora se puede determinar, por ejemplo, mediante la adición del complejo de péptido que se dirige al núcleo/sustancia heteróloga a las células y sometiendo a ensayo las células para determinar si la sustancia heteróloga ha sido entregada en el núcleo usando métodos conocidos en la técnica, tales como tinción inmunohistoquímica. La sustancia heteróloga se puede someter a ensayo para estudiar la actividad usando un método aceptable para el tipo de sustancia heteróloga (por ejemplo, un ensayo enzimático para una enzima, un ensayo de transformación para una oncoproteína, un ensayo anti-apoptótico para una proteína anti-apoptosis y un ensayo de inmortalización para una proteína de inmortalización). Estos ensayos son bien conocidos en la técnica y se describen en Sambrook et al., 1989 y Ausubel

et al., 1989.

5 Si el péptido que se dirige al núcleo y la sustancia heteróloga de polipéptido están ligados genéticamente, el resto de la carga del polipéptido puede formar un complejo ya sea con el extremo amino-terminal del péptido que se dirige al núcleo o con el extremo carboxi-terminal del péptido que se dirige al núcleo. Preferiblemente, el resto de la carga del polipéptido forma un complejo con el extremo N-terminal del péptido que se dirige al núcleo.

Como se ha mencionado anteriormente, los presentes inventores han mostrado que los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención deben comprender una serina o una treonina fosforilada en las posiciones X_1 y X_3 de la secuencia de aminoácidos o, alternativamente, aminoácidos fosfomiméticos en esas posiciones, tales como ácido glutámico y ácido aspártico con el fin de que tengan capacidades de translocación al núcleo.

10 Se apreciará por tanto, que si las posiciones X_1 y X_3 comprenden serina o treonina, la actividad de los péptidos que se dirigen al núcleo puede estar modulada. Por lo tanto, la actividad de estos péptidos que se dirigen al núcleo puede estar regulada al alza por cinasas de serina y/o treonina o reguladas a la baja por fosfatasas. La modulación de la actividad de los péptidos que se dirigen al núcleo se puede efectuar después de su introducción en la célula. Alternativa o adicionalmente, la modulación se puede efectuar de forma concomitante y/o antes de la introducción.

15 Otros agentes capaces de regular la actividad de los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención son aquellos que son capaces de activar o inhibir cinasas y fosfatasas aguas arriba. Ejemplos de agentes capaces de activar cinasas de Ser/Thr incluyen TPA, VOOH, TGF β y EGF.

20 Se apreciará que otros agentes capaces de modular la fosforilación de serina y/o treonina se pueden identificar usando los agentes peptídicos que dirigen al núcleo de la presente invención. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, los péptidos que se dirigen al núcleo están unidos a un resto detectable antes de la introducción en una célula. Un cambio en la localización del péptido que se dirige al núcleo en presencia del agente candidato, en relación con la localización del péptido que se dirige al núcleo en ausencia del agente candidato, indica que el agente es capaz de modular la fosforilación de serina y/o treonina.

25 Los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención se pueden administrar a las células ellos mismos o como parte de una composición farmacéutica, en donde se mezclan con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o varios de los ingredientes activos descritos en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. Los fines de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

30 En la presente memoria, la expresión "ingrediente activo" se refiere a los péptidos que se dirigen al núcleo de la presente invención ya sea solos o unidos a un agente heterólogo, o polinucleótidos que los codifican, que son responsables del efecto biológico.

35 De aquí en adelante, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que se pueden emplear indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y que no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante está incluido en estas expresiones. Uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio margen de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter et al. (1979)).

40 En la presente memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

45 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosal, transnasal, la entrega intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

50 Alternativamente, se puede administrar la preparación de una forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de una inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Un vector recombinante se puede administrar de varias maneras. Si se utilizan vectores que comprenden promotores específicos de células, por ejemplo, el procedimiento puede tener ventaja por la especificidad de la diana y, en consecuencia, no tiene que ser administrado localmente en el sitio afectado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos bien

conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de mezclado, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

5 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Una formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

10 Para la inyección, los ingredientes activos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosal, los agentes penetrantes apropiados para permear la barrera se utilizan en la formulación. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

15 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones para ingestión oral en un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones a base de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico, o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

25 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden emplear soluciones de azúcar concentradas, las cuales pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Colorantes o pigmentos se pueden añadir a los recubrimientos de comprimidos o de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

30 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión preparadas con gelatina, así como cápsulas blandas, selladas preparadas con gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos añadidos por mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir agentes estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

35 Para la administración bucal, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

40 Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación en pulverización de aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un dispensador se pueden formular de forma que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

45 Las preparaciones descritas en el presente documento se pueden formular para una administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

50 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones para inyección apropiadas basadas en aceite o agua. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución a base de agua estéril, exenta de pirógenos, antes del uso.

5 La preparación de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos que es eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales y tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

15 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares, y en estudios con animales, se pueden emplear para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual, de cara a la afección del paciente. [Véase por ejemplo, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 p.1].

20

25 Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser una sola administración o una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que dura desde varios días a varias semanas o hasta que la curación se lleva a cabo o se consigue una disminución del estado de enfermedad.

La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad del padecimiento, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

30 Se apreciará que los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden proporcionar al individuo con agentes activos adicionales para conseguir un efecto terapéutico mejorado, en comparación con un tratamiento con cada agente por separado. En una terapia de este tipo, se toman medidas (por ejemplo, la dosificación y la selección del agente complementario) frente a efectos secundarios adversos que pueden estar asociados con las terapias de combinación.

35 Las composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y marcar para el tratamiento de una afección indicada.

40 Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o varias formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o el dispositivo dispensador pueden ir acompañados por instrucciones para la administración. El envase o el dispensador también pueden estar alojados con una notificación asociada con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, en donde la notificación refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración a seres humanos o de tipo veterinaria. Tal notificación, por ejemplo, puede ser una etiqueta aprobada por la "Food and Drug Administration" de EE.UU. para medicamentos con receta o un prospecto de un producto aprobado.

45

50 Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la técnica después del examen de los siguientes ejemplos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se han expuesto anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación, tienen un soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención.

En general, la nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN moleculares, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes. Tales

técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., compilador (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant ADN", Scientific American Books, New York; Birren et al. (compiladores) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se indican en los documentos de Pat. de EE.UU. n° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., compilador (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., compilador (1994); Stites et al. (compiladores), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (compiladores), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo los documentos de Pat. de EE.UU. n° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., compilador (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., compiladores (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., compiladores (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., compiladores (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan en este documento. Los procedimientos en el mismo se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Reactivos: Acetato de tetradecanoil forbol (TPA), EGF, leptomicina B (LMB) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) se obtuvieron a partir de Sigma (St Louis, MI). Los conjugados de anticuerpo secundario (Ac) eran de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Los Acs anti c-Jun, tubulina E-19, HA-prob Y11 eran adquisiciones de Santa Cruz Biotechnology (CA) y el Ac de proteína verde fluorescente (GFP) de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). Los Acs para ERK1/2 doblemente fosforilada en TEY (pTEY-ERK), ERK general (gERK) y FLAG eran de Sigma Israel (Rehovot, Israel) que también producía y purificaba el Ac anti fosfo SPS-ERK (pSPS-ERK).

Tampones: Tampón A: β -glicerofosfato 50 mM (pH 7,3), EGTA 1,5 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM y vanadato de sodio 0,1 mM. El tampón H consistía en tampón A más benzamidina 1 mM, 10 μ g/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de leupeptina y 2 μ g/ml de pepstatina A. Tampón del ensayo de radio-inmunoprecipitación (RIPA): NaCl 137 mM, Tris 20 mM (pH 7,4), 10% (vol/vol) de glicerol, 1% de Triton X-100, 0,5% (peso/volumen) de desoxicolato, 0,1% (peso/vol) de SDS, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM y leupeptina 20 μ M. El tampón LS (tampón poco riguroso) consistía en HEPES 20 mM (pH 8,0), MgCl₂ 2 mM y EGTA 2 mM. Tampón HNTG: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,1% de Triton X-100 y 10% (vol/vol) de glicerol.

Cultivo celular y transfección: Las células COS7 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de suero bovino fetal (FBS) y se transfectaron usando el método de DEAE-dextrano como se ha descrito [H. Jaaro, H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3742 (1997)]. Las células CHO se cultivaron en F12-DMEM y se transfectaron mediante polietilenimina (PEI) como se ha descrito [Y. D. Shaul, R. Seger, J Cell Biol 172, 885 (13 de marzo 2006)]. Después de la transfección, las células se lavaron y se cultivaron en sus condiciones correspondientes. Los ARNsi se transfectaron utilizando oligofectamina (Dharmacon Inc., Lafayette, CO EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estructuras artificiales de ADN y mutaciones: GFP-ERK2 se preparó en pEGFP C1 (Clontech, Mountain View, CA) como se ha descrito [H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger, J. Biol. Chem. 274, 30349 (1999)] y GFP-MEK1 se preparó en pEGFP-N1 (Clontech, Z. Yao et al., Oncogene 20, 7588 (2001)). HA-MEK1 se preparó en pCMV-HA. GFP-MH2-SMAD3 y FLAG SMAD3 de longitud completa fueron cedidos amablemente por el Dr. Joan Massagué (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY). Las estructuras artificiales 2GFP fueron un regalo del Dr. Atan Gross (Weizmann Institute of Science, Rehovot Israel). En el extremo C terminal de la estructura artificial 2GFP se fusionó un segmento de 19 aminoácidos que contenía el SPS de ERK2 (L D Q L N H I L G I L G S P S Q E D L (SEQ ID NO: 6), denominado 2GFP-WT).

Las mutaciones puntuales se llevaron a cabo mediante el kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene, La Jolla, CA) y se confirmaron a través de la secuencia de nucleótidos. Las mutaciones eran: GFP-ERK244-6A (244-6A), GFP-ERK Δ 244-6 (Δ 244-6), GFP-ERK244/6A (ERK-AA), GFP-ERK244/6E (ERK-EE). Los residuos de Ser en el dominio SPS de 2GFP-WT, se mutaron a Ala (2GFP-AA) o a Glu (2GFP-EE). Los residuos 426-428 de FLAG-SMAD3 (ML) fueron sustituidos por Ala (ML-AAA) y la misma mutación se insertó en GFP-MH2 SMAD3 (MH2-AAA). Los residuos 426/428 de MH2-SAMD3 se reemplazaron por Glu (MH2-EE). Los residuos 386-8 en GFP-MEK1 se reemplazaron por Ala (MEK-AAA) o bien los residuos 386 y 388 se sustituyeron con Glu (MEK-EE). La Tabla 3 a continuación resume los cebadores usados para las estructuras artificiales de la presente invención.

60

Tabla 3

Estructura artificial	sentido	antisentido
ERKAAA	CACATCCTGGGTATTCTT GGAGCTGCAGCACAGGAAGAT SEQ ID NO: 7	ATCTTCCTGTGCTGCAGCT CCAAGAATACCCAGGATGTG SEQ ID NO: 8
ERKAPA	CCTGGGTATTCTTGGAGCTC CAGCACAGGAAGAT SEQ ID NO: 9	ATCTTCCTGTGCTGGAGCTC CAAGAATACCCAGG SEQ ID NO: 10
ERKEPE	CATCCTGGGTATTCTTGGAG AGCCAGAACAGGAAGATCTG SEQ ID NO: 11	CAGATCTTCCTGTTCTGGCTC TCCAAGAATACCCAGGATG SEQ ID NO: 12
SMAD AAA	GTCCTCACCCAGATGGGTGC TGCAGCCATCCGCTGTTCCAG SEQ ID NO: 13	CTGGAACAGCGGATGGCTGC AGCACCCATCTGGGTGAGGAC SEQ ID NO: 14
SMAD DPD	GTCCTCACCCAGATGGGCGA CCCAGACATCCGCTGTTG SEQ ID NO: 15	CAACAGCGGATGTCTGGGTG GCCCATCTGGGTGAGGAC SEQ ID NO: 16
MEK EPE	CAGCCCAGCGAACCCAGAA CATGCTGCTGGCGTC SEQ ID NO: 17	AGCATGTTCTGGTTCGCTG GGCTGGTTAAGGCC SEQ ID NO: 18
MEK AAA	CCTTAACCAGCCCAGCGCA GCAGCCCATGCTGC SEQ ID NO: 19	GCAGCATGGGCTGCTGCGC TGGGCTGGTTAAGG SEQ ID NO: 20
GFPGFSPS	TCGAGGCCACCATGCTTGAC CAGCTGAATCACATCCTGGG TATTCTTGGATCTCCATACA	CAGATCTTCCTGTGATGGAG ATCCAAGAATACCCAGGATG TGATTCAGCTGGTCAAGCAT
	GGAAGATCTGC SEQ ID NO: 21	GGTGGCC SEQ ID NO: 22
GFPGFAPA	TCGAGGCCACCATGCTTGACC AGCTGAATCACATCCTGGGTAT TCTTGGAGCTCCAGCACAGGAA GATCTGC SEQ ID NO: 23	CAGATCTTCCTGAGCTGGTGC TCCAAGAATACCCAGGATGT GATTCAGCTGGTCAAGCATG GTGGCC SEQ ID NO: 24
GFPGF EPE	TCGAGGCCACCATGCTTGACCA GCTGAATCACATCCTGGGTATT CTTGGAGAGCCAGAGCAGGAAG ATCTGC SEQ ID NO: 25	AATTCGCAGATCTTCCTGCTC TGGCTCTCCAAGAATACCCAG GATGTGATTCAGCTGGTCAAG CATGGTGGCC SEQ ID NO: 26

El ARNsi de importina-7 (SEQ ID NOs: 28-32) y el ARNsi de control se obtuvieron en Dharmacon Inc. (Lafayette, CO EE.UU.).

- 5 *Preparación de extractos celulares de células:* Las células se cultivaron hasta subconfluencia y luego se retiró el suero (0,1% de FBS) durante 16 h. Después de la estimulación, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo (PBS) y una vez con tampón A enfriado con hielo. Las células se rasparon en el tampón H (0,5 ml/placa) y se rompieron mediante ultrasonidos (dos impulsos durante 7 s de 50 W). Se centrifugaron los extractos (20.000 x g, 15 min, 4°C) y el material sobrenadante que contenía las proteínas citoplasmáticas y nucleares se analizó adicionalmente como se describe a continuación [D. M. Aebersold et al., Mol Cell Biol 24, 10000 (2004)].

10 *Transferencia Western:* El extracto celular se recogió como se ha descrito anteriormente y se separaron partes alícuotas de cada muestra (20 µg) mediante 10% de SDS-PAGE seguido de transferencia Western con los anticuerpos apropiados. Las transferencias se revelaron con Acs anti-Fab de ratón, anti-conejo y anti-cabra conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

15 *Fraccionamiento celular:* Las células COS7 transfectadas se privaron de nutrientes (0,1% de FBS) durante 16 h,

después de lo cual se lavaron con PBS enfriado en hielo, se suspendieron en tampón H enfriado con hielo y se centrifugaron (12.000 x g, 5 min). A continuación, las fracciones nucleares y citosólicas se aislaron como se ha descrito [H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger, J. Biol. Chem. 274, 30349 (1999)]. Brevemente, los sedimentos se suspendieron en 0,1% de NP-40, seguido de centrifugación (12.000 x g, 5 min). El material sobrenadante, que contenía la fracción citosólica, se hirvió en tampón de muestra. El sedimento se suspendió en tampón de extracción (NaCl 420 mM, β -glicerofosfato 50 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 1 mM, 25% de glicerol), se incubó sobre hielo durante 10 min, se sometió a ultrasonidos (50 W, 2 x 7 s) y se centrifugó (12.000 x g, 5 min). El material sobrenadante, que contenía la fracción nuclear, se sometió a transferencia Western.

Inmunoprecipitación. Los extractos celulares de células transfectadas estimuladas, se incubaron con anticuerpo anti-GFP conjugado previamente con perlas de A/G (Santa Cruz; (2 h, 4°C). A continuación, las perlas se lavaron dos veces con tampón HNTG y una vez con LiCl 0,5 M. El material inmunoprecipitado se sometió o bien a una transferencia Western como se ha descrito anteriormente o a un ensayo de fosfatasa *in vitro* como se describe en los Resultados.

Microscopía inmunofluorescente. Las células se fijaron (30 min en 3% de paraformaldehído en PBS o 10 min con metanol enfriado sobre hielo), seguido de permeabilización durante 5 min con 0,2% de Triton X-100 en PBS (23°C). Las células fijadas se incubaron secuencialmente con los Acs apropiados (45 min) seguido de Acs secundarios conjugados con rodamina (45 min) y DAPI. Los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón) de 400x aumentos.

EJEMPLO 1

Identificación del dominio SPS y su papel en la regulación de la acumulación nuclear basal de ERK2.

A pesar de que la regulación y el mecanismo subyacente de la translocación al núcleo de las ERKs sigue estando poco clara, estudios anteriores sugieren un papel del dominio de inserción de cinasa (KID; T. Lee et al., Mol Cell 14, 43 (2004)). Una mutagénesis completa de KID reveló que una secuencia de tres aminoácidos, compuesta por los residuos Ser244, Pro245 y Ser246 (SPS) era un dominio significativo para la localización nuclear de las ERKs. Para examinar la funcionalidad de esta región, estos tres residuos fueron reemplazados por Ala (244-6A) o se deletaron (Δ 244-6) y se expresaron al alza en células CHO y células COS7.

RESULTADOS

A diferencia de la información sobre una acumulación nuclear de GFP-ERK2 en células CHO [H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger, J. Biol. Chem. 274, 30349 (1999)], ambos mutantes se localizaron principalmente en el citoplasma (Figuras 1A-F). Estos resultados se validaron utilizando una expresión al alza en células COS7 (Figuras 1G-L), que contenían una cantidad mucho mayor de proteínas expresadas de forma ectópica, implicando claramente al dominio SPS en la regulación de la localización subcelular de ERK2 en las células inactivas. Unos resultados similares con más células se muestran en la Figura 1 M-R.

Ejemplo 2

El dominio SPS desempeña un papel en la translocación al núcleo de ERK2 después de una estimulación

Puesto que la translocación al núcleo de las ERKs, se inicia generalmente como respuesta a una estimulación extracelular, los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el fin de examinar también el papel del dominio SPS en esta translocación dependiente de estímulo. Con el fin de hacer un seguimiento del transporte cito-nuclear de ERK dependiente de ligando, las estructuras artificiales de ERK se cotransfectaron con MEK1, que actúa como una proteína de anclaje, para asegurar la localización citoplásmica de las ERKs en el estado basal.

RESULTADOS

Tal y como se esperaba, WT-GFP-ERK2 cotransfectada [H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger, J. Biol. Chem. 274, 30349 (1999)] se localizaba en el citoplasma de las células CHO en reposo y se translocaba al núcleo después de la estimulación con TPA (250 nM). Sin embargo, los dos mutantes de SPS permanecieron localizados en el citoplasma, independientemente de la estimulación con TPA (Figuras 2A-X). Una posible razón de esta falta de translocación podría ser una fosforilación reducida de los residuos Thr y Tyr dentro del motivo TEY de los mutantes. De hecho, la tasa de fosforilación de los mutantes detectados por el anticuerpo anti pTEY-ERK era menor que la de WT-ERK2 (Figura 3), indicando que el dominio SPS está implicado en la fosforilación de las ERKs mediante mEKs. Para determinar si la retención citoplásmica de los mutantes de SPS después de la estimulación con TPA es un resultado de una fosforilación reducida de TEY, pero es inherente a los mutantes, los niveles de fosforilación se equilibraron utilizando diferentes concentraciones de TPA (10 nM para WT-ERK2 y 250 nM para los mutantes, Figura 3). También con niveles de fosforilación equivalentes, WT-GFP-ERK2 se localiza en el núcleo, mientras que los mutantes de SPS siguen restringidos al citoplasma. La anulación de la translocación al núcleo facilitada de los mutantes de SPS también se detectó usando diferentes agentes estimulantes tales como EGF y VOOH (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados indican que la translocación al núcleo anulada es una propiedad intrínseca de los mutantes y no es el resultado de una fosforilación reducida de TEY. Esta conclusión se ve apoyada además

por el hallazgo de que 244-6A-ERK2 interaccionaba con MEK1 y se separaba de la misma después de la estimulación, de manera similar a WT-ERK2 (Figura 3). Por lo tanto, el cambio que se induce con la mutación de SPS afecta parcialmente solo a la fosforilación mediante MEKs, pero no a la unión o la separación, lo que confirma que no hay grandes cambios conformacionales que estén inducidos por las mutaciones. Por lo tanto, la falta de acumulación nuclear de ERK2 mutada en SPS se debe probablemente a otro efecto, inherente a esa región. Tomados en conjunto, estos datos implican al dominio SPS en la mediación de la translocación al núcleo de las ERKs, tanto en células en reposo como después de una estimulación extracelular.

Ejemplo 3

Los residuos de Ser en el dominio SPS están fosforilados después de la estimulación celular

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el fin de examinar si los residuos de serina dentro de la nueva secuencia de translocación comprenden sitios de fosforilación potenciales. De hecho, la secuencia del dominio SPS y sus residuos circundantes (Gly-Ser-Pro-Ser-Gln-Glu-Asp - SEQ ID NO: 3) consisten en varios sitios de fosforilación de consenso para proteínas cinasas, tales como MAPKs, CDKs, CKII y ATM. Por lo tanto, se examinó la posibilidad de que los residuos de Ser dentro del dominio SPS se sometieran a una fosforilación adicional de forma concomitante con la translocación al núcleo. Un análisis mediante espectroscopia de masas se realizó sobre material inmunoprecipitado de GFP-ERK2 extraído a partir de células COS7 estimuladas o no estimuladas.

RESULTADOS

Se encontró que, además de un péptido digerido con tripsina que contenía el motivo TEY fosforilado, un péptido correspondiente al dominio SPS contenía un fosfato incorporado. El péptido SPS fosforilado se detectó en GFP-ERK2 activada, pero no en la proteína obtenida a partir de las células no estimuladas (datos no mostrados). Dado que los únicos aceptores de fosfo en este péptido eran los dos residuos de Ser en el SPS, es posible que la aparición de este péptido represente una fosforilación de un residuo de Ser dentro de este dominio.

Ejemplo 4

Caracterización de la fosforilación de SPS mediante un anticuerpo específico

Para estudiar más a fondo la ocurrencia y el papel de la fosforilación de SPS, se obtuvo un anticuerpo policlonal (Ac) dirigido contra un péptido SPS doblemente fosforilado. Es probable que una preparación de un Ac de este tipo incluya un Ac dirigido o bien contra cada Ser monofosforilada o contra la Ser doblemente fosforilada.

RESULTADOS

En una transferencia Western, el anticuerpo reconocía débilmente una banda de 72 kDa, que se correspondía con una GFP-ERK2 inmunoprecipitada procedente de células COS7 transfectadas, desprovistas de nutrientes (Figura 4A). Este reconocimiento de GFP-ERK2 se incrementaba significativamente cuando GFP-ERK2 inmunoprecipitaba a partir de células estimuladas con VOOH, TPA y EGF, lo que sugiere que SPS se fosforila después de la estimulación. De hecho, el curso del tiempo de la estimulación con EGF reveló un aumento transitorio de la fosforilación de SPS, que alcanzó su punto máximo 15 minutos después de la estimulación y disminuyó a partir de ahí (Figura 4B). Este curso de tiempo era más lento que la fosforilación de TEY que alcanzó su punto máximo 5 minutos después de la estimulación. Esta tasa de fosforilación de SPS se correlaciona mejor con la translocación, lo que sugiere eventos secuenciales en la activación de las ERKs y su posterior fosforilación de SPS y translocación al núcleo. Patrones de fosforilación similares detectadas por el Ac, también se encontraron con ERKs endógenas a partir de células estimuladas con EGF o VOOH (Figura 4E)

El tratamiento de la ERK2 fosforilada con fosfatasa alcalina mostraba una reducción significativa de la inmunorreactividad del Ac anti fosfo-SPS (Figura 4C), así como del Ac de control anti fosfo-TEY, lo que confirma la calidad de los anticuerpos. La pequeña reducción de la inmunorreactividad después del tratamiento con fosfatasa de ERK2 no estimulada, indica que la cantidad de SPS-ERK2 fosforilada en células inactivas es baja y que el anticuerpo anti fosfoSPS puede reconocer también una cantidad mínima de ERK2 no fosforilada. Finalmente, se encontró que la ERK2 mutada en TEY que no contiene fosfatos en ese sitio (TEY-AAA) todavía puede ser reconocida por el Ac anti fosfoSPS después de la estimulación (Figura 4G), indicando de nuevo que el Ac es específico del fosfato de SPS y no reconoce ningún otro fosfato incorporado de ERK2. En conjunto, estos resultados identifican una nueva fosforilación dependiente de estimulación de las ERKs en su dominio SPS.

Ejemplo 5

La fosforilación de SPS está mediada en parte por una autofosforilación de ERK

Puesto que la fosforilación de SPS parece estar correlacionada con la activación de la cascada de ERK, se examinó la posibilidad de que esta fosforilación estuviera mediada por los componentes de esta cascada. Debido al lento transcurso de tiempo de la fosforilación (Figura 4B) y debido a la especificidad de las cinasas Raf aguas arriba y MEKs que no pueden fosforilar esta secuencia (Yoon y Seger, 2006, Growth Factors, 24, 21-44), se examinó la

posibilidad de que la o las cinasas se localicen aguas abajo de las MEKs.

RESULTADOS

El Ac anti pSPS, que detectaba GFP-ERK2 a partir de células estimuladas mediante EGF, no reaccionaba con GFP-ERK2 inmunoprecipitada a partir de células que se habían tratado previamente con el inhibidor de MEK, U0126, antes de la estimulación (Figura 4H). Algunas proteínas cinasas aguas abajo de las MEKs que pueden estar implicadas en la fosforilación de SPS, son ellas mismas ERKs (autofosforilación), ya que su sitio de fosforilación de consenso incluye Ser/Thr seguido por una Pro (Yoon y Seger, 2006, Growth Factors, 24, 21-44). Por lo tanto, los presentes inventores examinaron si las cinasas implicadas en la fosforilación son ellas mismas ERKs. Para este fin se empleó GFP-ERK2 inmunoprecipitada purificada, así como TEY-AAA-ERK2 y ERK2 en la que los dos residuos de Ser en la secuencia de SPS estaban sustituidos por Ala (SPS-APA). Estas tres proteínas se sometieron a una fosforilación *in vitro* a través de o bien una GST-ERK2 (GST-ERK) purificada de baja actividad, GST-ERK2 activa (Act-ERK) preparada a partir de bacterias que coexpresan MEK1 activa (Jaaro et al., 1997, PNAS, 94, 3742-3747) y GST-ERK2 inactiva en la que la Lys en el sitio de unión del ATP se había sustituido por un residuo de Ala (KA-ERK). Como era de esperar, la incorporación de ³²P en GFP-ERK2 se detectó principalmente cuando esta proteína se incubaba con Act-ERK2. La fosforilación de TEY-AAA se redujo en ~25%, mientras que la de SPS-APA se redujo en ~80% (Figura 4I). Estos resultados indican que las ERKs activas se pueden autofosforilar *in trans* en el dominio SPS. Por lo tanto, ERK2 y probablemente otras cinasas aguas abajo de las MEKs podrían ser, al menos en parte, las cinasas que fosforilan el dominio SPS después de una estimulación.

Ejemplo 6

20 *La translocación al núcleo de las ERKs está mediada por la fosforilación de SPS*

Tanto la fosforilación en el dominio SPS como la anulación de la translocación al núcleo a través de los mutantes de SPS, sugiere que la fosforilación puede ser necesaria para la translocación al núcleo dependiente de una estimulación de ERK2. Para estudiar más a fondo esta posibilidad, los dos residuos de Ser se sustituyeron en el dominio de SPS, o bien con Glu que actúa como un residuo fosfomimético, o con Ala como control.

25 RESULTADOS

GFP-EPE-ERK2 mostraba una localización nuclear pronunciada, mientras que el mutante APA mostraba una distribución citoplásmica similar a la de la estructura artificial 244-6A (Figuras 5A-F y las Figuras 1M-R). Estas diferencias en la distribución se confirmaron mediante un ensayo de fraccionamiento subcelular que mostró que aproximadamente el 75% de WT-ERK2, el 95% de EPE-ERK2 y solo el 5% de APA-ERK2 se localiza en el núcleo, 48 horas después de la transfección (Figura 6). La diferencia entre WT-ERK2 y EPE-ERK2 era aún más pronunciada poco después de la transfección (Figuras 7A-H), indicando que EPE-ERK2 se transloca al núcleo más rápido que WT-ERK2. Por lo tanto, estos resultados indican que, efectivamente, la fosforilación de SPS desempeña una función para facilitar la translocación de ERK2 al núcleo. Se obtuvieron resultados similares también después de un tratamiento con leptomicina B (LMB) que impide la exportación nuclear (Figuras 15A-R), lo que indica que la mutación de SPS modula la importación nuclear y la no exportación de ERKs. Además, la translocación inducida por SPS parece ser importante para la actividad aguas abajo de ERKs, ya que los mutantes con fosforilación insuficiente evitaban la proliferación celular inducida por suero, mientras que el fosfomimético EPE-ERK2 mejoraba ligeramente de este proceso (Figura 16).

Ejemplo 7

40 *Uso de una quimera de GFP para estudiar el papel de SPS fosforilado*

Para validar la importancia general del dominio SPS, una secuencia de 19 aminoácidos que rodeaba SPS o los mutantes APA y EPE, se fusionó con un dímero de proteínas GFP (2GFP). Se detectó una distribución celular de las quimeras en células CHO, 24 h después de la transfección de las estructuras artificiales de GFP.

RESULTADOS

45 La estructura artificial 2GFP-SPS estaba localizada por toda la célula, 2GFP-APA aparecía principalmente en el citoplasma y la región perinuclear y 2GFP-EPE se detectaba principalmente en el núcleo (Figuras 8A-H). Estos resultados fueron confirmados por un experimento de fraccionamiento subcelular que proporcionaba unos resultados esencialmente similares a los de los experimentos de inmunotinción (5% de 2GFP, 15% de 2GFP-SPS, 3% de 2GFP-APA y 90% de 2GFP-EPE estaban localizados en el núcleo; Figura 9A). Como se esperaba, el péptido SPS en la quimera 2GFP se fosforilaba después de una estimulación con EGF o VOOH (Figura 9B), lo que sugiere que la cinasa de SPS no requiere una conformación de ERK para su acción.

55 Como se ha mostrado, el dominio SPS actúa de forma autónoma y, por lo tanto, puede competir con señales SPS endógenas. De hecho, 2GFP-SPS citoplásmica expresada al alza y más aún 2GFP-APA, pero no 2GFP-EPE nuclear, inhibían la translocación inducida con TPA de ERKs endógenas (Figuras 10M-X). La falta del efecto inhibidor esperado de 2GFP-EPE reside probablemente en su acumulación nuclear rápida, lo que impide su posible

influencia sobre las ERKs endógenas citoplasmáticas. Es de señalar que ninguno de los mutantes tenía un efecto sobre la localización de las ERKs en células en reposo (Figuras 10A-L), lo que indica que el dominio SPS compite con la translocación de las ERKs endógenas solo cuando están fosforiladas. Por lo tanto, los presentes hallazgos implican al dominio SPS fosforilado como una nueva señal general de translocación al núcleo (NTS).

5 Ejemplo 8

El dominio SPS fosforilado desempeña un papel en la translocación al núcleo de SMAD3

La translocación inducida por SPS fosforilado de la proteína inerte 2GFP llevó a los presentes inventores a estudiar más a fondo la generalidad de este dominio en la translocación al núcleo de otras moléculas de señalización. Una búsqueda de homología de secuencias reveló que SMAD3, una proteína de señalización que se transloca al núcleo después de la estimulación con TGF β [J. Massagué, S. W. Blain, R. S. Lo, Cell 103, 295 (13 octubre, 2000), contiene un dominio SPS en la región MH2 (Figura 20) que se había implicado previamente en la translocación al núcleo de la proteína [L. Xu, C. Alarcón, S. Col, J. Massagué, J Biol Chem 278, 42569 (24 octubre 2003)].

RESULTADOS

Los presentes inventores encontraron que la translocación al núcleo inducida con TGF- β está mediada por la importina-7, ya que el silenciamiento génico de esta proteína evitaba la translocación de la proteína SMAD3 endógena (Figura 17A-B). Utilizando un Ac anti pSPS, se encontró que WT-Flag-SMAD3 se fosforila en su dominio SPS después de la estimulación con VOOH, TPA y TGF β (Figura 11E). Por lo tanto, parece probable que el SPS de SMAD3 operaba de manera similar al de ERK2. Para examinar si este SPS de SMAD3 está implicado en la translocación al núcleo, WT-Flag-SMAD3 y Flag-SMAD3 en donde el dominio SPS se había reemplazado por tres residuos de Ala (AAA-SMAD3), se expresaron al alza en células CHO y se examinó su localización.

De manera similar a ERK2, la expresión al alza de WT-Flag-SMAD3 daba como resultado su localización nuclear, mientras que el mutante se encontraba principalmente en el citoplasma (Figuras 11A-D). Para una caracterización adicional del dominio SPS de SMAD3, se utilizó una forma truncada de la proteína que contenía todos los elementos requeridos para la localización subcelular apropiada de la proteína (MH2, [L. Xu, C. Alarcón, S. Col, J. Massagué, J Biol Chem 278, 42569 (24 de octubre 2003)]) y, muy importante, también el dominio SPS. La región MH2 se fusionó con GFP (WT-MH2) y el dominio SPS fue reemplazado o bien con tres Ala (AAA-ML) o los dos residuos de Ser con Asp (DPD-ML). La expresión al alza de WT-MH2 dio como resultado una distribución nuclear, mientras que AAA-MH2 y DPD-MH2 se localizaban en el citoplasma o en el núcleo, respectivamente, tal como se detectó mediante microscopía de fluorescencia (Figuras 12A-F) o mediante estudios de fraccionamiento en los que el 75% de WT-MH2, el 7% de AAA-MH2 y el 88% de DPD-MH2 se localizaban en el núcleo (Figura 13). Por lo tanto, SMAD3, como ERK2, contiene un dominio SPS fosforilado importante para su translocación al núcleo.

Ejemplo 9

La importina-7 media en la translocación al núcleo dependiente de estimulación de las ERKs de una manera dependiente de Ran

La translocación al núcleo de las ERKs (Chen et al., 1992, Mol Biol Cell, 12, 915-927), puede tener lugar ya sea mediante una difusión pasiva o mediante un transporte activo (Adachi et al., 1999, EMBO J, 18, 5347-5358), que se rige por diversos mecanismos diferentes (Yazicioglu et al., 2007, J Biol Chem). En Drosophila se sugirió que la D-importina-7 (DIM-7) era responsable de la acumulación de ERKs en el núcleo durante el desarrollo (Lorenzen et al., 2001, Development, 18, 1403-1414). Por lo tanto, los presentes inventores examinaron si el análogo en mamíferos de esta proteína tiene un papel en la translocación de ERK también en los mamíferos.

RESULTADOS

La transfección del ARNsi de importina-7 de mamífero a células HeLa reduce drásticamente la translocación inducida por EGF de ERK2, en comparación con la translocación detectada en las células transfectadas con el control de ARNsi (Figura 18A). Por otra parte, el ARNsi de la importina-7 solo tenía un ligero efecto inhibitorio sobre la acumulación nuclear pasiva de WT-ERK2 expresada al alza (Figura 18B). En ambos experimentos, las células transfectadas con Si-importina-7 perdieron una cantidad considerable de importina-7, pero no otras proteínas tales como ERKs que sirvieron como control (Figura 18C). Por otra parte, se encontró que la importina-7 puede interaccionar tanto con ERK2 expresada al alza (Figura 18D) como con ERKs endógenas (Figura 18E) y la interacción se incrementaba de manera significativa después de una estimulación con EGF. Por lo tanto, estos resultados indican que la importina-7 es un agente regulador importante de la translocación al núcleo inducida por activación, de ERKs, pero mucho menos pasiva.

A continuación, se examinó la posible participación de la pequeña GTPasa Ran, un agente regulador importante del transporte nuclear. En el transporte dependiente de NLS, la importina- α , une su carga que contiene NLS en el citoplasma, que contiene principalmente RanGDP y después del transporte a través de los poros nucleares libera la carga en el núcleo después de la unión de RanGTP nuclear al complejo. Por lo tanto los presentes inventores examinaron si el complejo importina-7-ERK también estaba regulado por Ran, examinando las posibles

interacciones entre los componentes. De hecho, se encontró que la importina-7 interacciona específicamente con Ran-GTP y no con Ran-GDP, o Ran sin una guanidina cargada (NG; Figura 18F). Por otra parte, la presencia de Ran-GTP, pero no de Ran-GDP, causaba una disociación del complejo importina7-ERK (Figura 18G), lo que indica que el complejo importina-7-ERK está regulado por Ran-GTP de forma similar a los complejos de las otras importinas. Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la translocación al núcleo activa de las ERKs está mediada por la importina-7 y que este proceso está regulado por Ran.

Ejemplo 10

El dominio TPT fosforilado tiene un papel en la translocación al núcleo de MEK1

Otras proteínas que se translocan al núcleo después de una estimulación son las MEKs [H. Jaaro, H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3742 (1997)]. Se encontró que de manera similar a ERK2 y SMAD3, también la translocación de MEK al núcleo estaba mediada, al menos en parte, por la importina-7 (Figuras 17A-B). Curiosamente, las MEKs no contienen un dominio SPS, sino que más bien tienen una secuencia TPT próxima a una región que participa en la determinación de su localización subcelular [H. Cha, E. K. Lee, P. Shapiro, J Biol Chem 276, 48494 (21 diciembre, 2001)]. Esta secuencia TPT también se observó que se fosforilaba después de una estimulación celular [S. Matsuda, Y. Gotoh, E. Nishida, J Biol Chem 268, 3277 (15 febrero, 1993)], y estaba implicada en una interacción proteína-proteína que podía determinar la localización subcelular [A. Nantel, K. Mohammad-Ali, J. Sherk, B. I. Posner, D. Y. Thomas, J Biol Chem 273, 10475 (24 abril 1998)]. El siguiente experimento se realizó con el fin de examinar si el transporte cito-nuclear de las MEKs requiere la fosforilación de esta NTS putativa. Los dos residuos de Thr en el dominio TPT de MEK1-GFP se reemplazaron por residuos Ala o Glu y se observó su localización subcelular después de una expresión al alza en las células CHO.

Como se esperaba por la presencia de una señal de exportación nuclear (NES) en las MEKs, WT-MEK1-GFP y los mutantes estaban localizados principalmente en el citoplasma de células no tratadas (Figuras 14A-R). La adición del inhibidor de la exportina B, leptomicina (LMB, [Z. Yao et al., Oncogene 20, 7588 (2001)]) inducía una translocación al núcleo moderada de WT-MEK1, lo cual se incrementó en EPE-MEK1 y se anuló en AAA-MEK1. La estimulación de las células con TPA aumentaba la acumulación nuclear de WT-MEK1-GFP pero no la de EPE-MEK1 que se localizaba en el núcleo, incluso sin estimulación. Es importante destacar que AAA-MEK1 se localizaba en el citoplasma, lo que confirma que al igual que con ERK2, el dominio TPT tiene un papel en la translocación estimulada y no solo en el transporte no regulado de MEK1. Por lo tanto, de forma similar a los dominios SPS de ERK2 y SMAD3, el dominio TPT media en la translocación al núcleo de MEK1.

Ejemplo 11

El dominio SPS fosforilado es necesario para la interacción de ERK2 con la importina-7 y la liberación desde la proteína del poro nuclear (NUP).

El hallazgo de que la importina-7 está implicada en la translocación al núcleo de las ERKs, llevó a los presentes inventores a examinar si era necesaria la fosforilación de SPS para ese proceso. También se examinó la posible implicación de la importina- β , que parece cooperar con la importina-7 en algunos sistemas de transporte nuclear.

RESULTADOS

Se examinó la interacción de los diversos mutantes de SPS con la importina-7 y la importina- β . Los experimentos de coimmunoprecipitación revelaron que la interacción WT-ERK2-importina-7 se incrementa significativamente después de una estimulación con TPA (Figura 19A). La prevención de la fosforilación de SPS utilizando la mutación APA reducía la interacción, principalmente después de una estimulación, mientras que el uso de la mutación EPE fosfomimética incrementaba dramáticamente la interacción con o sin estimulación. Se obtuvieron resultados similares usando las estructuras artificiales 2GFP (Figura 19B), ya que SPS conjugado con 2GFP se unía a la importina-7, la secuencia de APA reducía esta interacción y EPE la elevaba. Por otra parte, no se detectó ninguna interacción con la importina- β en los mismos experimentos, lo que indicaba que esta proteína no está implicada directamente en la translocación y afirmando la especificidad de la reacción de coimmunoprecipitación. Estos resultados demuestran claramente la implicación de SPS fosforilado en la translocación estimulada, dependiente de importina-7, de las ERKs al núcleo.

Otro mecanismo que se había sugerido que desempeñaba un papel en la translocación al núcleo de las ERKs es su interacción directa con las NUPs. El examen de esta interacción en el presente sistema, reveló que de hecho WT-ERK2 interacciona con Nup153 y la interacción se incrementa ligeramente después de una estimulación. Sorprendentemente, la interacción con NUP153 se incrementaba, no disminuía, con el mutante APA, mientras que la interacción con el mutante EPE se reducía. Este resultado puede indicar que la interacción con Nup153 está mediada principalmente por otros residuos de ERK2 y se requiere fosfo-SPS para la liberación de las ERKs desde las NUPs, lo que facilita la translocación al núcleo de las ERKs. Por lo tanto, la fosforilación del dominio SPS parece tener un papel doble en el transporte nuclear: mejorando la interacción con la importina-7 adaptadora y acelerando la liberación desde las NUPs.

CONCLUSIONES

La translocación al núcleo de moléculas de señalización es crucial para su funcionamiento correcto dependiente de estímulo en la regulación de procesos celulares tales como la proliferación y la diferenciación. Curiosamente, muchas de estas proteínas no contienen la NLS canónica y su mecanismo de translocación al núcleo no se entiende completamente. Los presentes inventores han identificado una nueva secuencia que parece actuar como una NTS general en las proteínas de señalización. El papel principal de las NTSs canónicas y otras NLSs raras [D. Christophe, C. Christophe-Hobertus, B. Pichon, *Cell Signal* 12, 337 (mayo, 2000)] es el transporte al núcleo de proteínas que están retenidas constantemente en el núcleo en virtud de su unión mediada por NLS a la cromatina o a proteínas estructurales [G. Schlenstedt, *FEBS Lett* 389, 75 (24 de junio 1996)]. Curiosamente, a diferencia de las proteínas reguladas por NLS, ERK2 [M. Costa et al., *J Cell Sci* 119, 4952 (1 de diciembre 2006)] y otras proteínas se transportan rápidamente entre el citosol y el núcleo después de una estimulación. Estas diferencias en el modo de transporte pueden sugerir que la NTS dependiente de la fosforilación identificada en este documento, tiene un papel en la translocación al núcleo reversible dependiente de estímulo, de estas proteínas de señalización.

El mecanismo de acción de la NTS ha sido estudiado ampliamente en este documento y se constató que el principal papel de fosfo-SPS es inducir la importación al núcleo y no ralentizar la exportación a través de los poros o el aumento del anclaje a las proteínas nucleares (Figuras 15A-R).

Basándose en los resultados obtenidos en este documento, los presentes inventores proponen un nuevo mecanismo para la regulación de la localización subcelular de las ERKs. Por lo tanto, en las células en reposo, las ERKs están asociadas a varios anclajes citoplasmáticos, lo que está mediado por varios dominios de interacción de proteínas (Chuderland y Seger, 2005, *Mol Biotechnol*, 29, 57-74). La fosforilación de su dominio TEY a través de MEKs induce un cambio conformacional que activa las proteínas e induce su desprendimiento de la mayoría de los anclajes (Wolf et al., 2001, *J Biol Chem* 276, 24490-24497). Las proteínas separadas se fosforilan a continuación en su dominio SPS a través de cinasas que pertenecen a la cascada de ERK, incluyendo las propias ERKs (Figuras 4A-I). Esta fosforilación permite entonces una asociación de las ERKs activas con la importina-7 (Figuras 18A-G y Figuras 19A-C) que conduce las ERKs a través de los poros nucleares dentro del núcleo. Esta translocación dependiente de la importina-7 no requiere la ayuda de la importina- β (Figuras 19A-C) que parece ser necesaria para la importina-7 en algunos, pero no todos, los sistemas (Gorlich et al., 1997; Jakel y Gorlich, 1998). La penetración real a través del poro requiere también la fosforilación de SPS, ya que parece paliar la interacción fuerte con las NUPs (Figuras 19A-C) y permite un deslizamiento adecuado por el poro. Una vez que el complejo importina-7-ERK alcanza el núcleo, es reconocido por Ran-GTP (Figuras 18A-G) y esta pequeña GTPasa induce la disociación de las ERKs desde el complejo de translocación, para permitir su interacción con sustratos nucleares. Los presentes resultados también indican que procesos muy similares, dependientes de importina-7 y NTS, están involucrados en la translocación al núcleo de SMAD3 y MEK1 (Figuras 11-14).

El supuesto anterior describe la translocación activa al núcleo de las ERKs después de una estimulación. Sin embargo, se ha observado que las ERKs se pueden translocar dentro del núcleo también a través de un mecanismo pasivo coexistente (Adachi et al., 1999, *EMBO*, 18, 5347-5358). Los presentes resultados indican que la fosforilación de SPS también se requiere para este tipo de translocación, ya que las ERKs expresadas al alza se acumulan en el núcleo de células en reposo de una manera dependiente de SPS (Figuras 5-7 y Figuras 1M-R). Los presentes inventores también muestran que el dominio SPS también puede estar fosforilado sin una fosforilación previa de TEY (Figuras 4A-I) y este proceso podría ser el mediador del transporte pasivo de las ERKs. Aunque después de la fosforilación de SPS, ERK puede interaccionar con la importina-7 para inducir la translocación al núcleo pasiva lenta, es posible que esta translocación tenga lugar sin la participación de un vehículo de transporte. En este caso, las ERKs pueden difundir directamente a los poros nucleares y en ese caso la fosforilación de SPS se requiere únicamente para un deslizamiento correcto a través del poro como se ha mencionado anteriormente. Adicionalmente, los presentes resultados indican que la dimerización, que se había sugerido que estaba implicada en la translocación al núcleo de las ERKs (Khokhlatchev et al., 1998, *Cell* 93, 605-615) no es necesaria, ni para la translocación activa ni para la pasiva.

Sorprendentemente, se ha encontrado que, a diferencia de la interacción con las importinas, la fosforilación de SPS disminuye más que aumenta la unión de ERKs a NUP-153 (Figura 19C). Este resultado puede sugerir que la unión a las NUPs está mediada por otros residuos, adyacentes al dominio SPS, que podrían ser residuos complementarios en la NTS dependiente de SPS. La fosforilación de SPS o bien reduce esa afinidad de la unión a los residuos que interaccionan o eleva su K_{off} , un proceso que da como resultado una liberación más rápida desde las NUPs y permite un deslizamiento suave a través de los poros nucleares. Una unión de este tipo podría estar mediada por regiones hidrófobas, las cuales se había mostrado previamente que eran importantes en la unión de las NUPs a diversas proteínas (Bailiss et al., 2002, *J Biol Chem* 277, 50597-50606). Por lo tanto, las regiones hidrófobas en las proximidades del dominio SPS se han implicado en la translocación al núcleo de SMAD3 (Xu et al., 2003, *J Biol Chem*, 278, 42569-42577) y ERK2 (Lee et al., 2004, *Mol Cell* 14, 43-55) y los presentes inventores observaron que existe también una región hidrófoba proximal en MEK1 (Figura 20).

Un análisis de la secuencia mostró que la NTS está presente en las secuencias de proteínas reguladoras de la señalización de transporte al núcleo y puede inducir de forma similar su translocación al núcleo. Una proteína de este tipo es la ciclina-B, en la cual la región requerida para la translocación contiene un dominio SPS en una región

rica en Ser (Walsh et al., 2003). La fosforilación con ERK de residuos de Ser en esa región se observó que era importante para el mecanismo de translocación y, por lo tanto, es probable que actúe a través de SPS fosforilado y colabore con el mecanismo de NTS identificado en el presente documento. Otras proteínas de transporte al núcleo que contienen NTS, son SMAD2 y SMAD4, JNK2, AKT, STAT4, BRCA1, APC y p53.

- 5 En resumen, los presentes inventores han identificado una nueva NTS general que participa en la translocación al núcleo de proteínas de señalización después de una estimulación extracelular. Se requiere una fosforilación de la NTS para el transporte dinámico y reversible. La generalidad y la autonomía de la función de la NTS han sido validadas mediante una expresión al alza de la quimera 2GFP fusionada con una secuencia de 19 aminoácidos que contiene la NTS. El mecanismo de translocación implica una interacción dependiente de la fosforilación con la importina-7 y la liberación desde las NUPs, así como una disociación del complejo de importina-7 a través de Ran-GTP. Este mecanismo parece funcionar, al menos en parte, en la translocación al núcleo pasiva y estimulada. Se ha identificado y caracterizado la translocación al núcleo dependiente de NTS para ERK2, SMAD3 y MEK1, pero la presencia de secuencias similares en otras proteínas de señalización sugiere que la NTS identificada puede tener un papel general en la translocación al núcleo dependiente de una estimulación de la proteína de señalización.
- 10
- 15 Se aprecia que ciertas características de la invención, que para mayor claridad se describen en el contexto de realizaciones distintas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Listado de secuencias

- 20 <110> Yeda Research And Development Co. Ltd.
Seger, Rony
Chuderland, Dana
- <120> SECUENCIAS QUE SE DIRIGEN AL NÚCLEO
- <130> F-20212/EP-SS
- 25 <140> EP 08710249.7
<141> 28.02.2008
- <150> US 60/903,852
<151> 2007-02-28
- <160> 34
- 30 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Secuencia consenso de una señal de localización nuclear
- <220>
<221> característica_misc
<222> (1) .. (1)
- 40 <223> se puede seleccionar del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico
- <220>
<221> característica_misc
<222> (3) .. (3)
<223> se puede seleccionar del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico
- 45 <400> 1
Xaa Pro Xaa
1
- <210> 2
<211> 18
<212> PRT
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 662 036 T3

<223> Un tramo de 19 aminoácidos que contiene la señal SPS de ERK2

<400> 6

Leu	Asp	Gln	Leu	Asn	His	Ile	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Glu Asp Leu

<210> 7

5 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

10 <400> 7

cacatcctgg gtattcttgg agctgcagca caggaagat 39

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 8

atcttctgt gctgcagctc caagaatacc caggatgtg 39

20 <210> 9

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 9

cctgggtatt ctggagctc cagcacagga agat 34

<210> 10

<211> 34

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 10

35 atcttctgt gctggagctc caagaatacc cagg 34

<210> 11

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 11

catctctgggt attcttgag agccagaaca ggaagatctg 40

<210> 12

45 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

<400> 12
 cagatctcc tgtctggct ctccaagaat acccaggatg 40

5 <210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

10 <400> 13
 gtcctcacc agatgggtgc tgcagccatc cgctgtcca g 41

<210> 14
 <211> 41

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

20 <400> 14
 ctggaacagc ggatggctgc agcaccatc tgggtgagga c 41

<210> 15
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

<400> 15
 gtcctcacc agatgggca cccagacatc cgctgttg 38

<210> 16
 <211> 38

30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

35 <400> 16
 caacagcga tgtctgggtc gcccatctgg gtgaggac 38

<210> 17
 <211> 33

40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

<400> 17
 cagcccagcg aaccagaaca tgctgctggc gtc 33

<210> 18
 <211> 33

45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonulceótido de ADN monocatenario

50

ES 2 662 036 T3

<400> 18
 agcatgttct ggttcgctgg gctgggtaag gcc 33

5 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

10 <400> 19
 ccttaaccag cccagcgcag cagcccatgc tgc 33

<210> 20
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 20
 gcagcatggg ctgctgcgct gggctggta agg 33

20 <210> 21
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

25 <400> 21
 tcgagggccac catgcttgac cagctgaatc acatcctggg tattcttgga tctccatcac 60

aggaagatct gc 72

<210> 22
 <211> 67
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 22
 cagatcttcc tgtgatggag atccaagaat acccaggatg tgattcagct ggtcaagcat 60

ggtggcc 67

35 <210> 23
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

40 <400> 23
 tcgagggccac catgcttgac cagctgaatc acatcctggg tattcttgga gctccagcac 60

aggaagatct gc 72

<210> 24
 <211> 67

45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de SiARN

<400> 30

5 guauuggccu gaucgagaau u 21

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido de SiARN

<400> 31

gcacugacuc acggucuuau u 21

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

20 <223> señal de localización nuclear de SMAD3

<400> 32

Leu	Gln	Trp	Leu	Asp	Lys	Val	Leu	Thr	Gln	Met	Gly	Ser	Pro	Ser	Ile
1				5					10					15	

Arg Cys

<210> 33

<211> 18

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<223> señal de localización nuclear de ERK2

30 <400> 33

Leu	Asp	Gln	Leu	Asn	His	Ile	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Glu Asp

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<223> señal de localización nuclear de MEK1 n

<400> 34

Trp	Leu	Cys	Ser	Thr	Ile	Gly	Leu	Asn	Gln	Pro	Ser	Thr	Pro	Thr	His
1				5					10					15	

40 Ala Ala

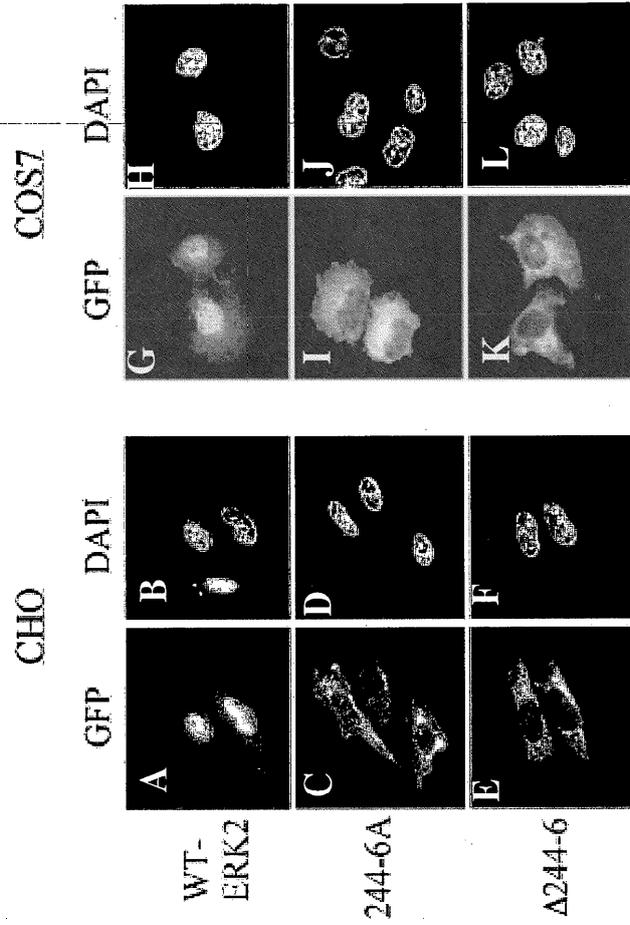
REIVINDICACIONES

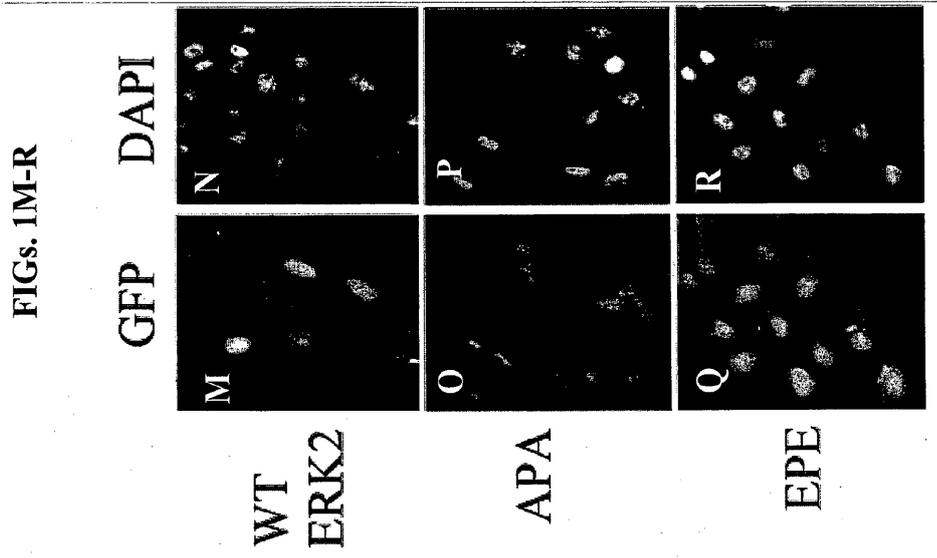
1. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga a una secuencia como se indica por

L D Q L N H I L G I L G X₁ P X₂ Q E D;

- 5 en la que X₁ y X₂ son aminoácidos no fosforilables, siendo capaz el péptido aislado de evitar una translocación al núcleo de ERK.
2. El péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia como se indica por SEQ ID NO: 5.
3. El péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia como se indica por SEQ ID NO: 3.
4. El péptido según la reivindicación 1, que comprende ácido mirístico.
- 10 5. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que comprende el péptido según la reivindicación 1.
6. Una estructura artificial de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado según la reivindicación 5.
7. El péptido según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.
8. El péptido según la reivindicación 7 para uso, en donde dicha enfermedad hiperproliferativa es cáncer.
- 15 9. El péptido según la reivindicación 8 para uso, en donde dicho cáncer es melanoma.

FIGs. 1A-L





FIGs. 2A-X

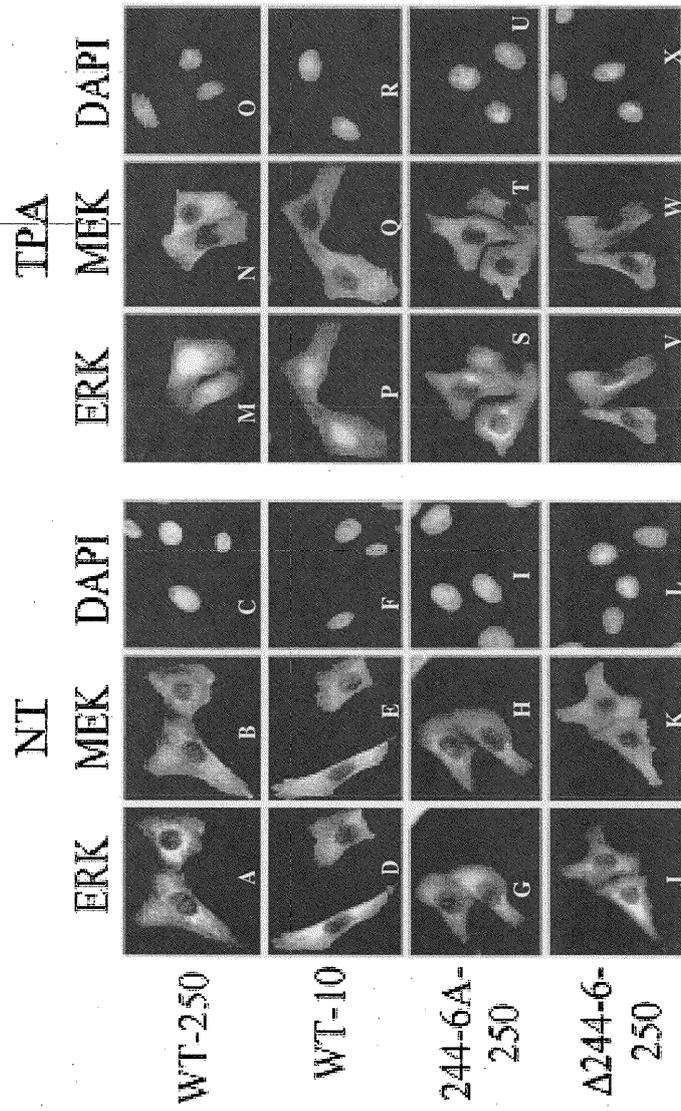
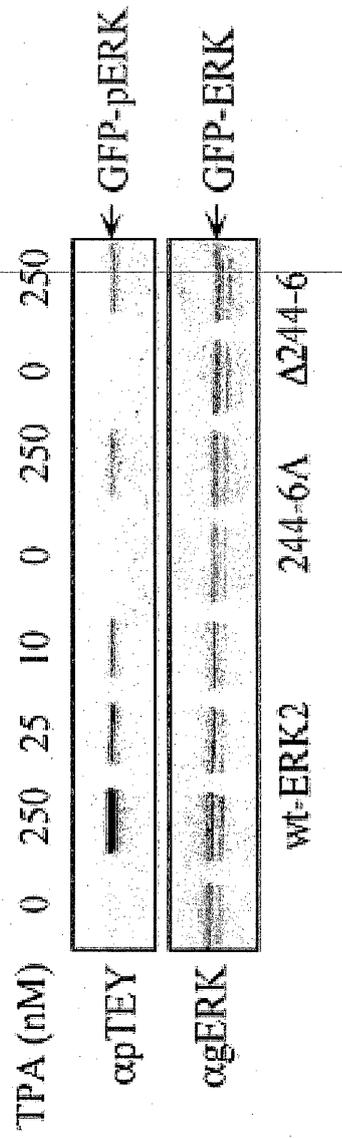
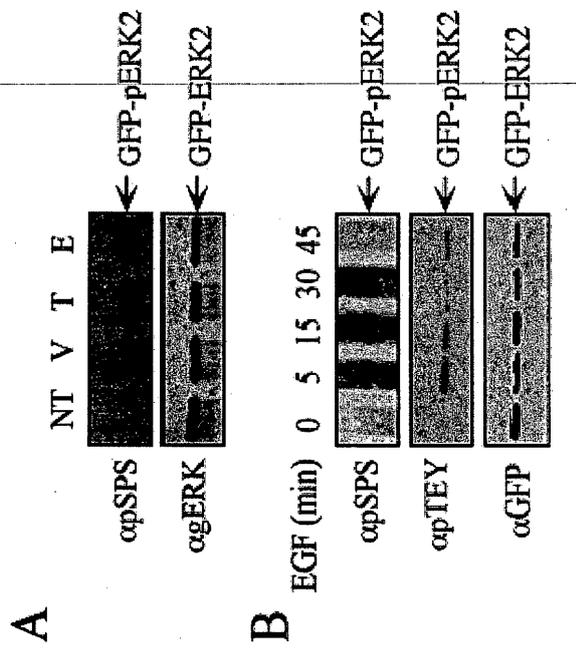


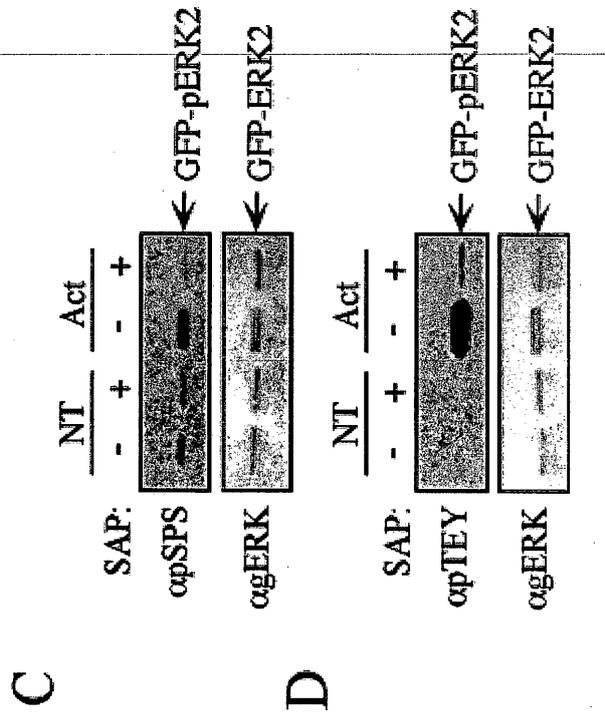
FIG. 3



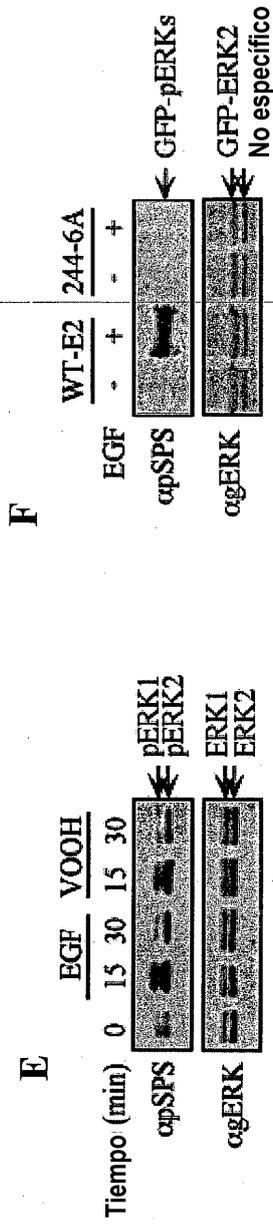
FIGs. 4A-B



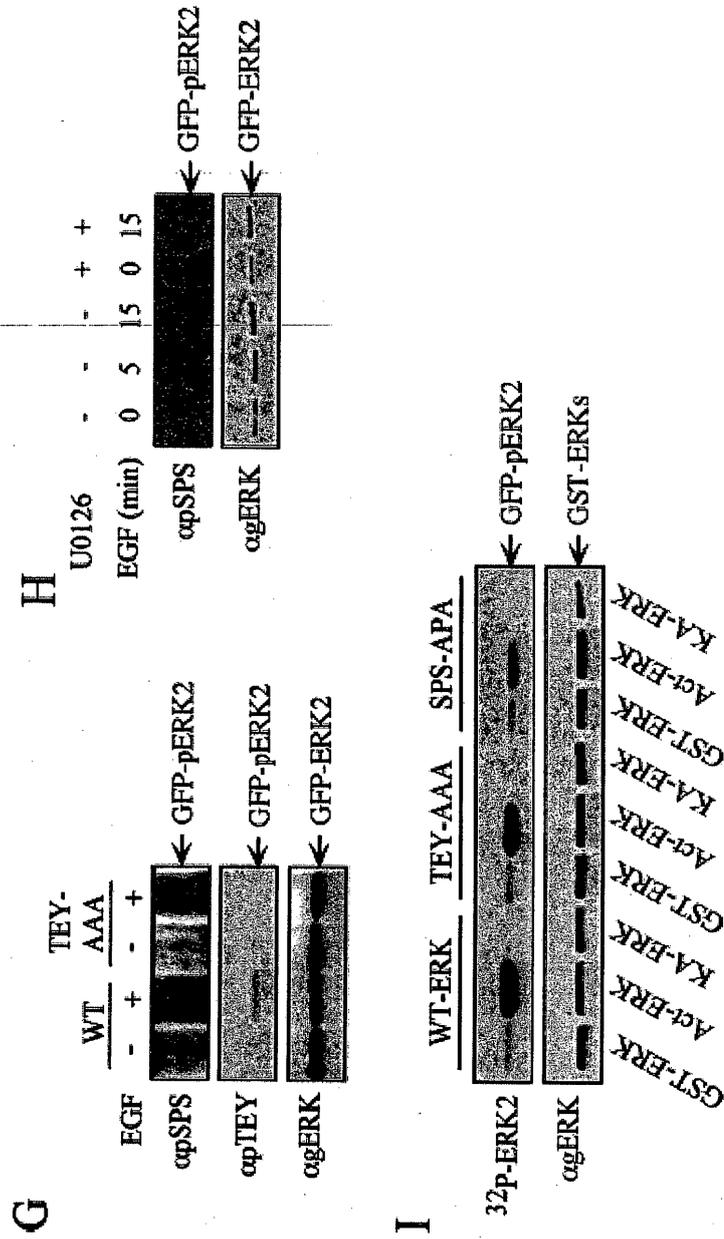
FIGs. 4C-D



FIGs. 4E-F



FIGS. 4G-I



FIGs. 5A-F

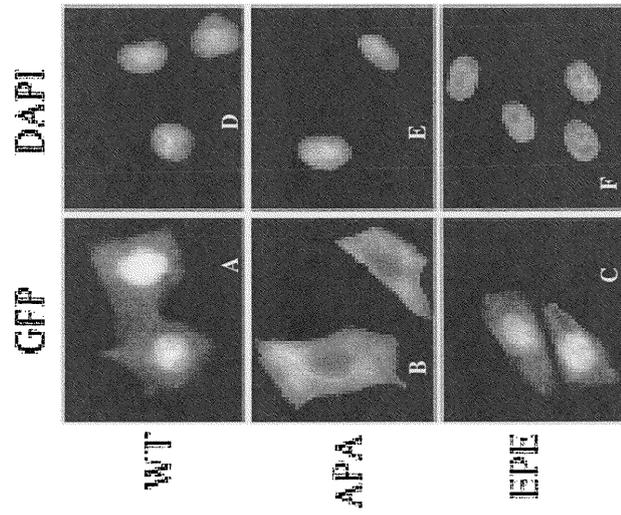
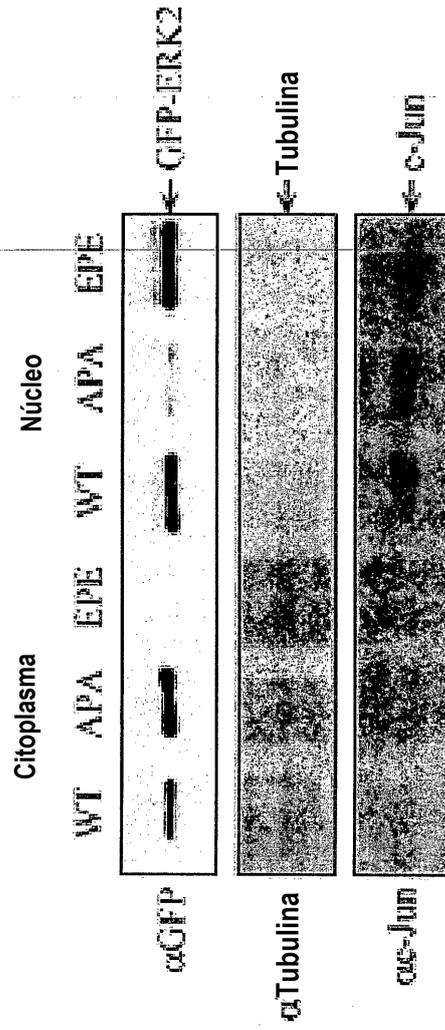
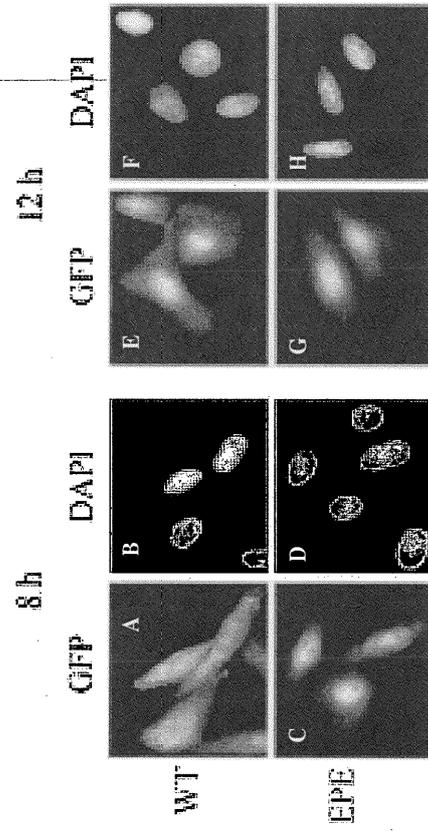


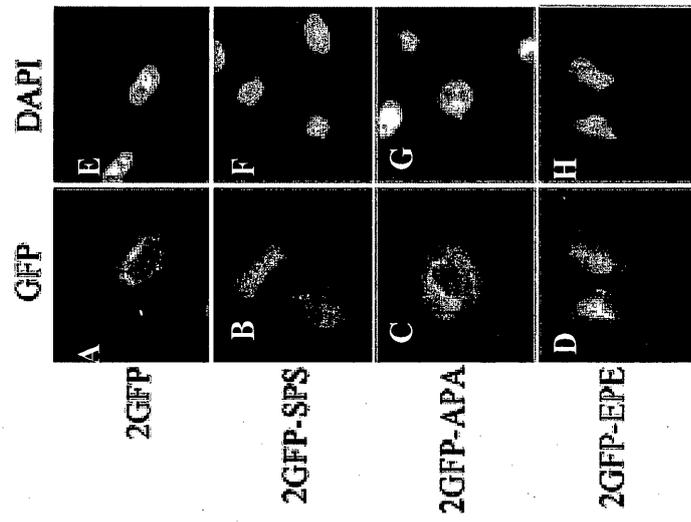
FIG. 6



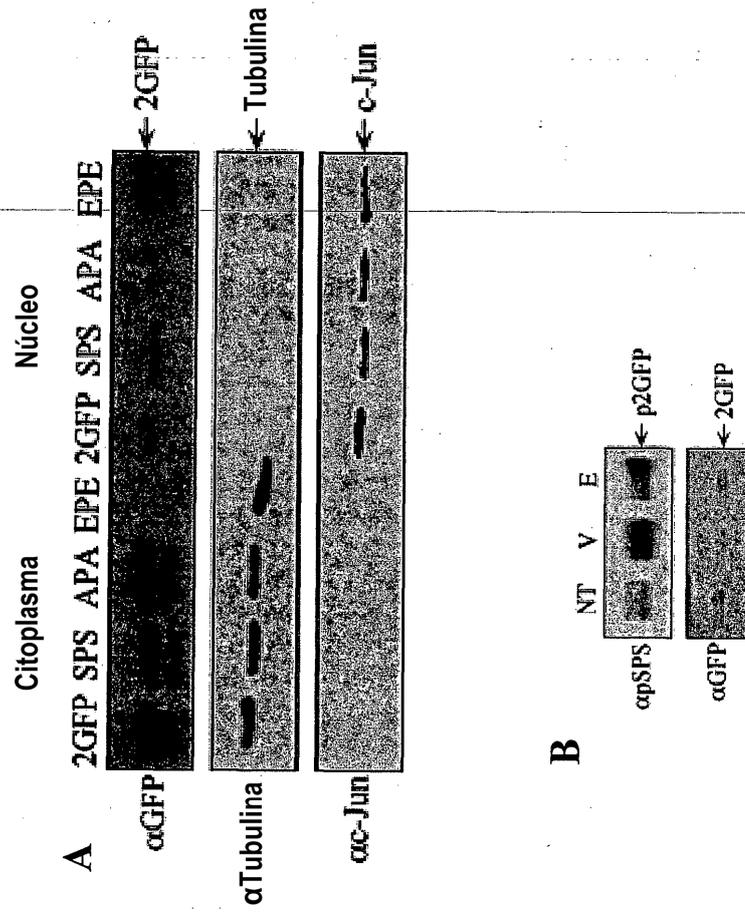
FIGs. 7A-H



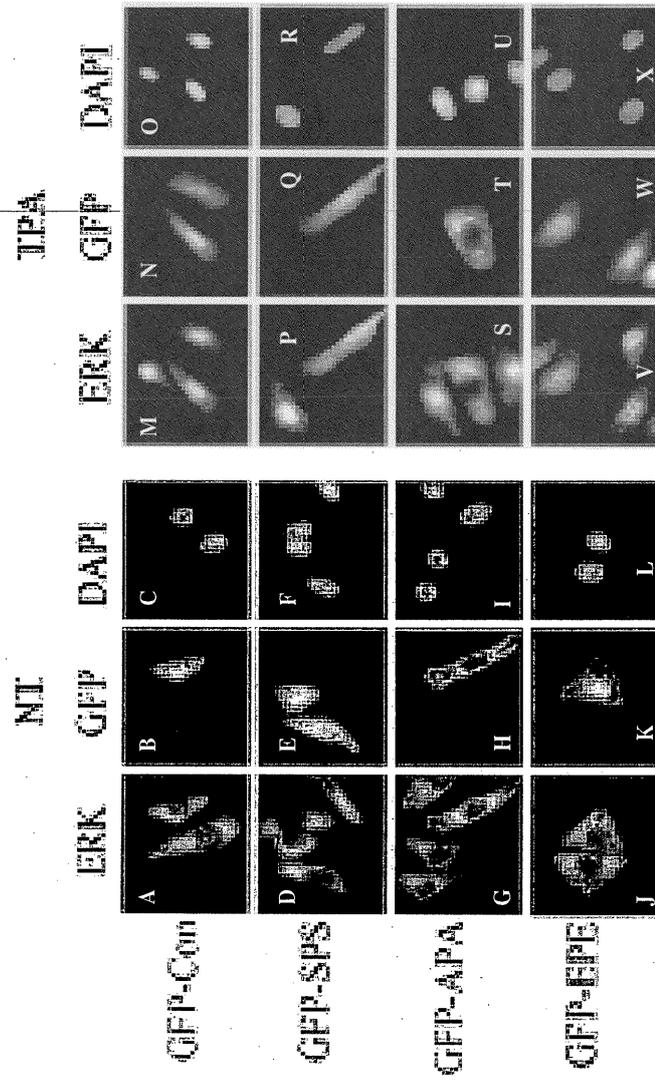
FIGs. 8A-H



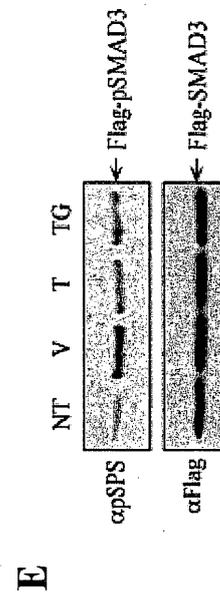
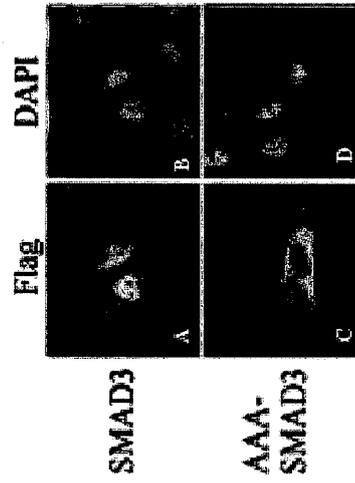
FIGs. 9A-B



FIGs. 10A-X



FIGs. 11A-E



FIGs. 12A-F

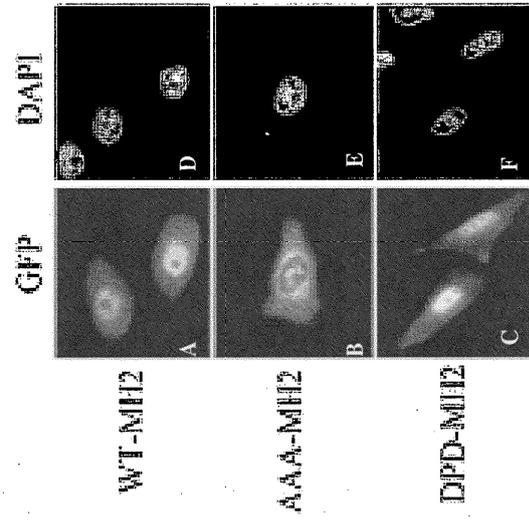
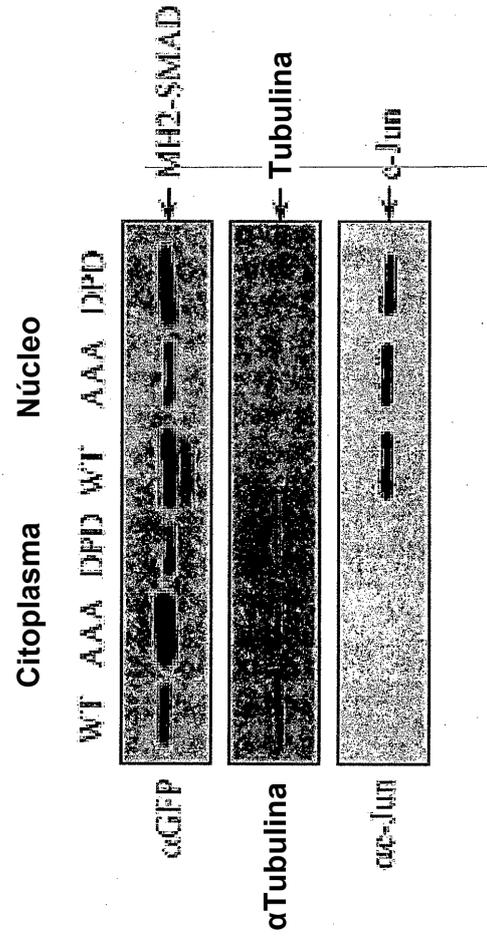
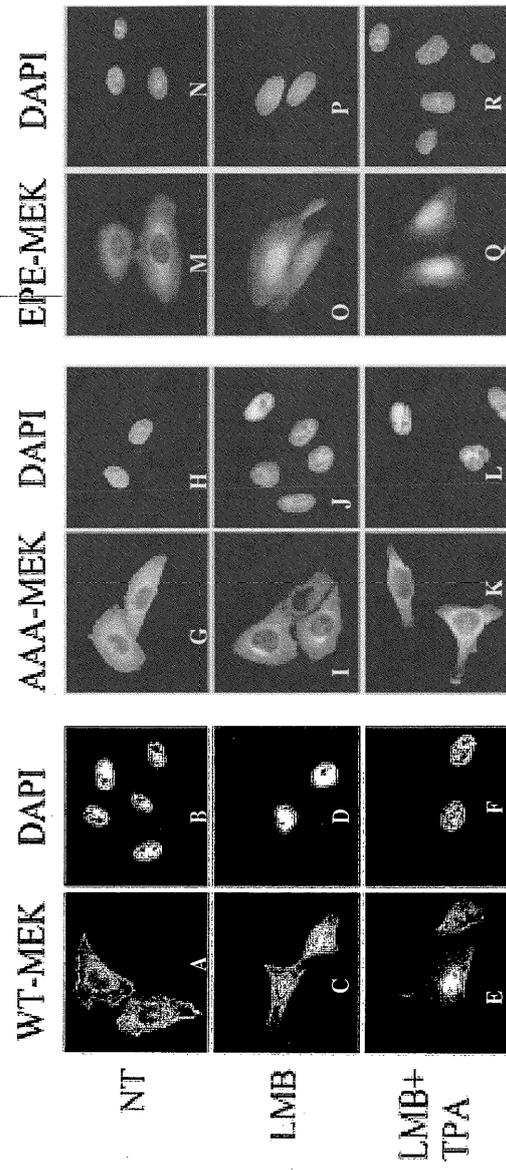


FIG. 13



FIGs. 14A-R



FIGs. 15A-R

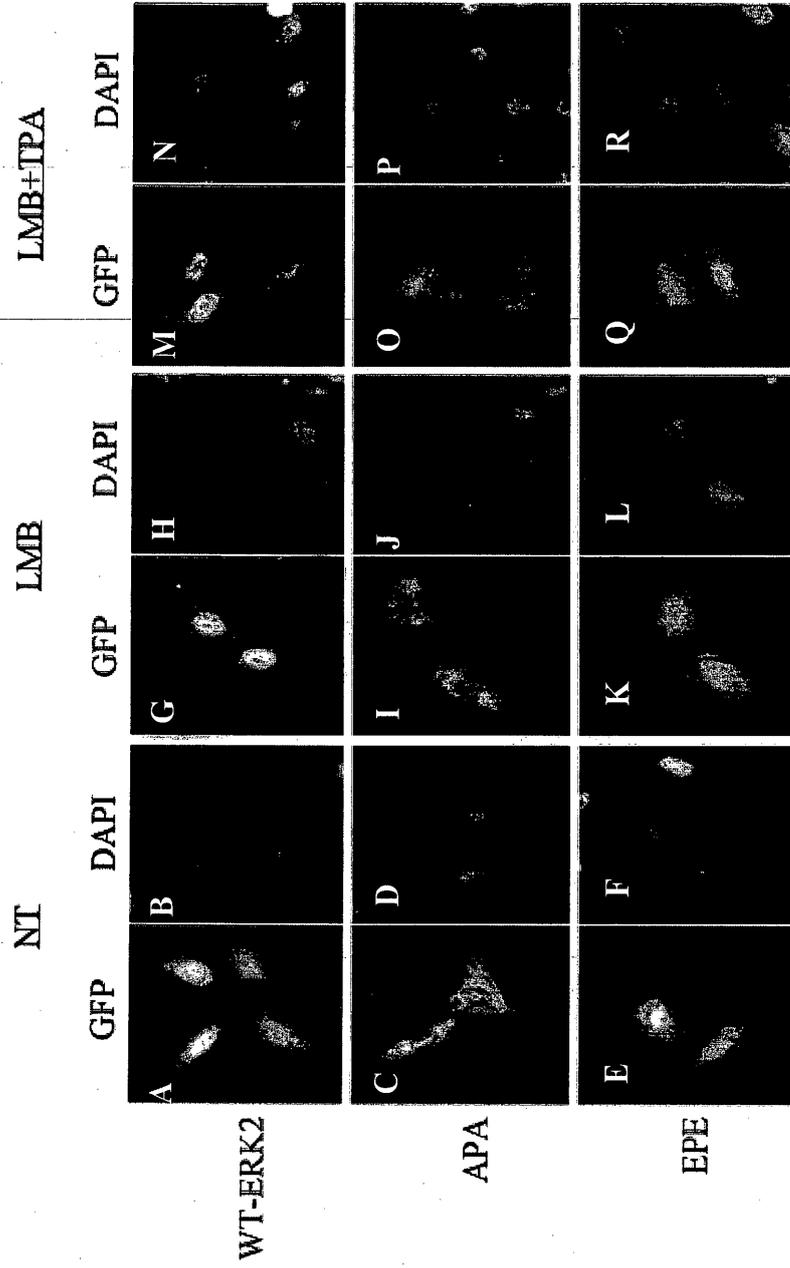
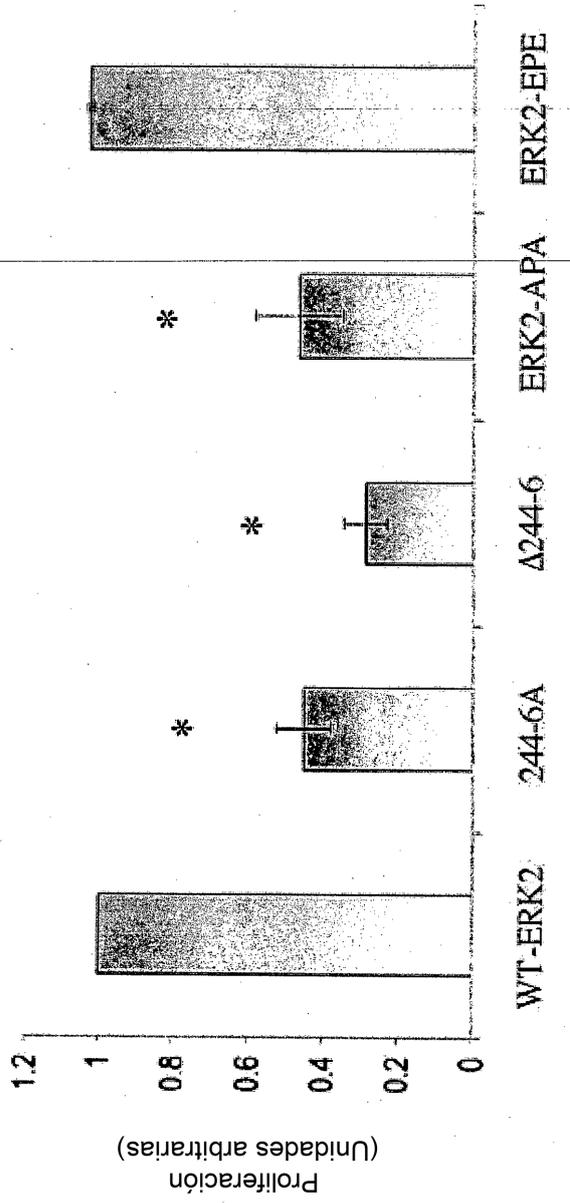
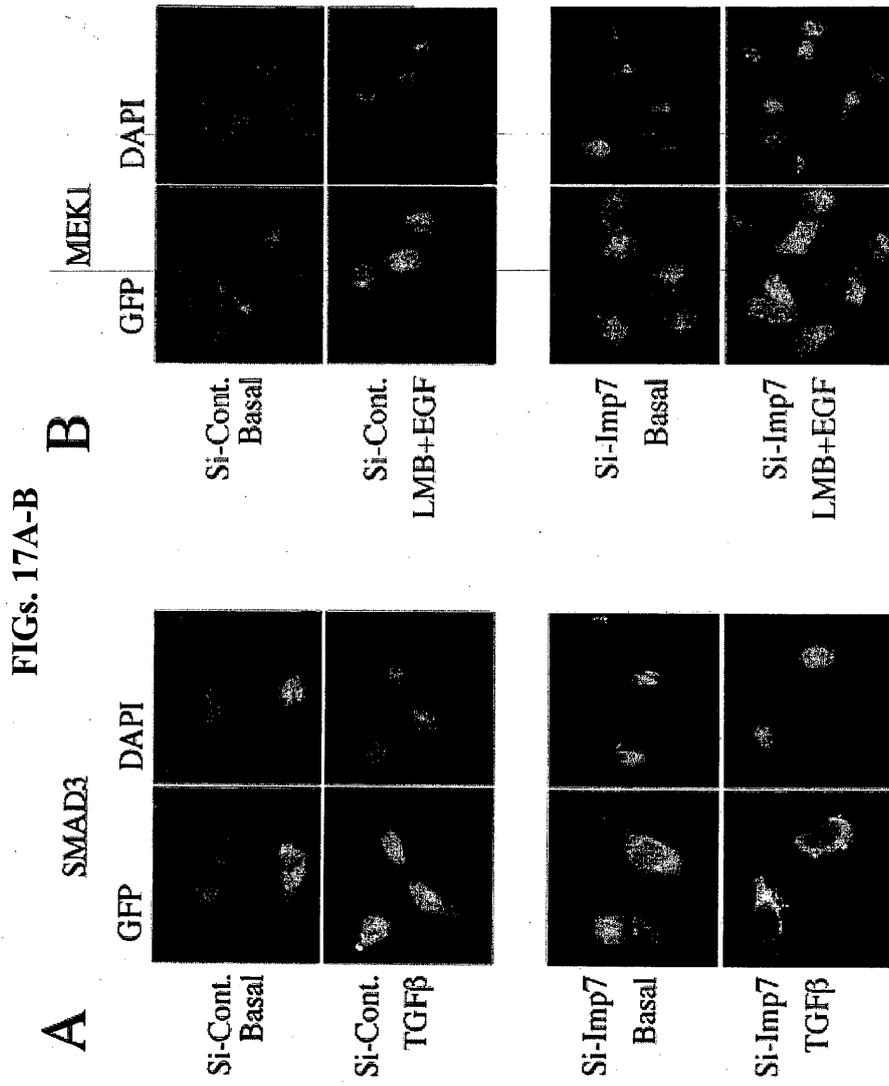
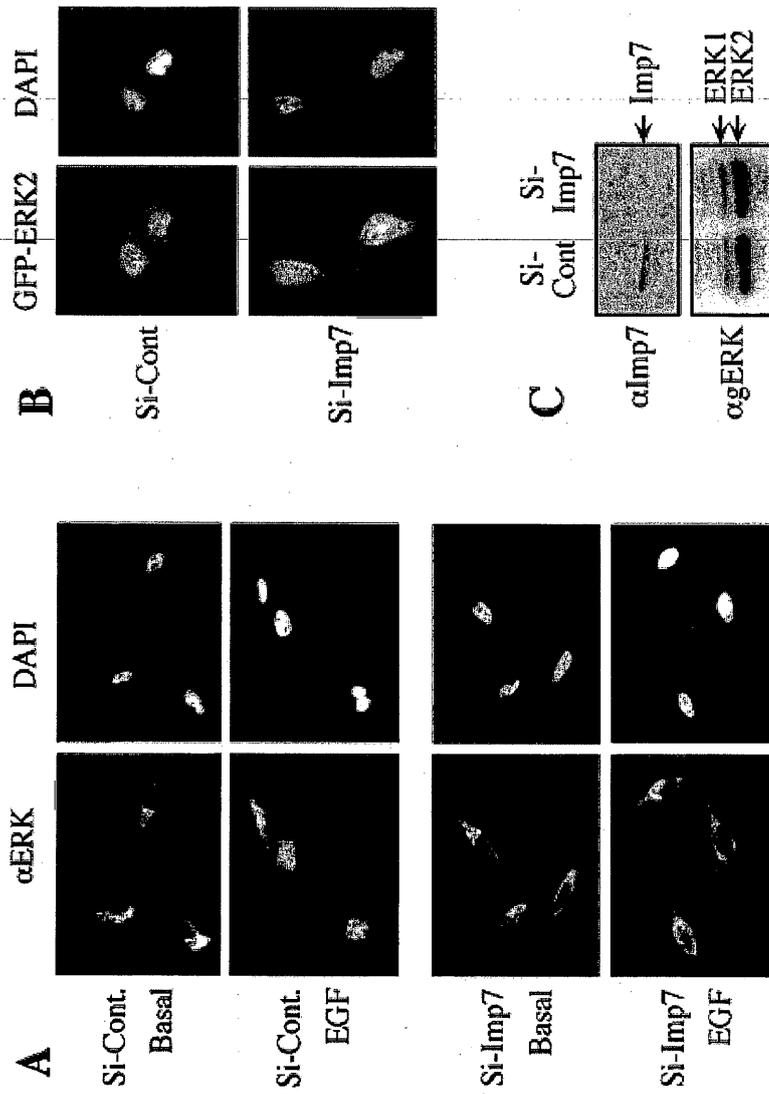


FIG. 16





FIGs. 18A-C



FIGs. 18D-G

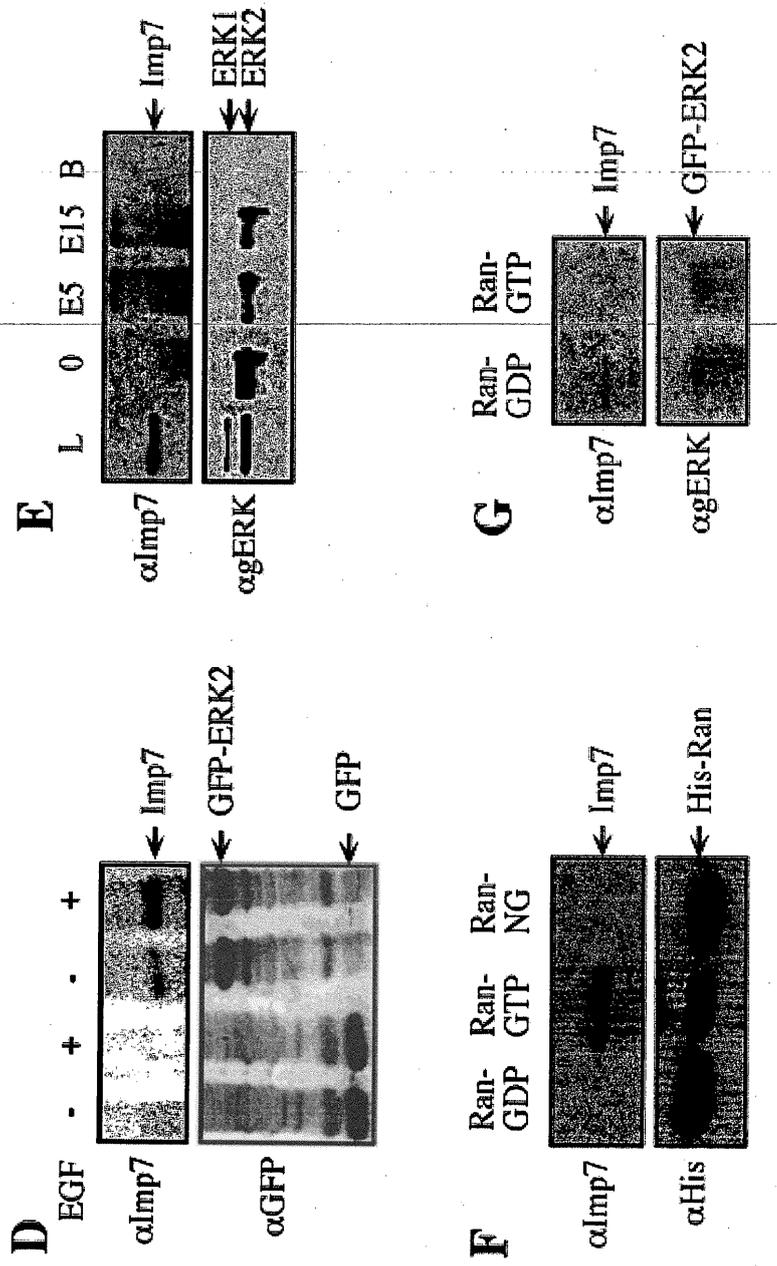
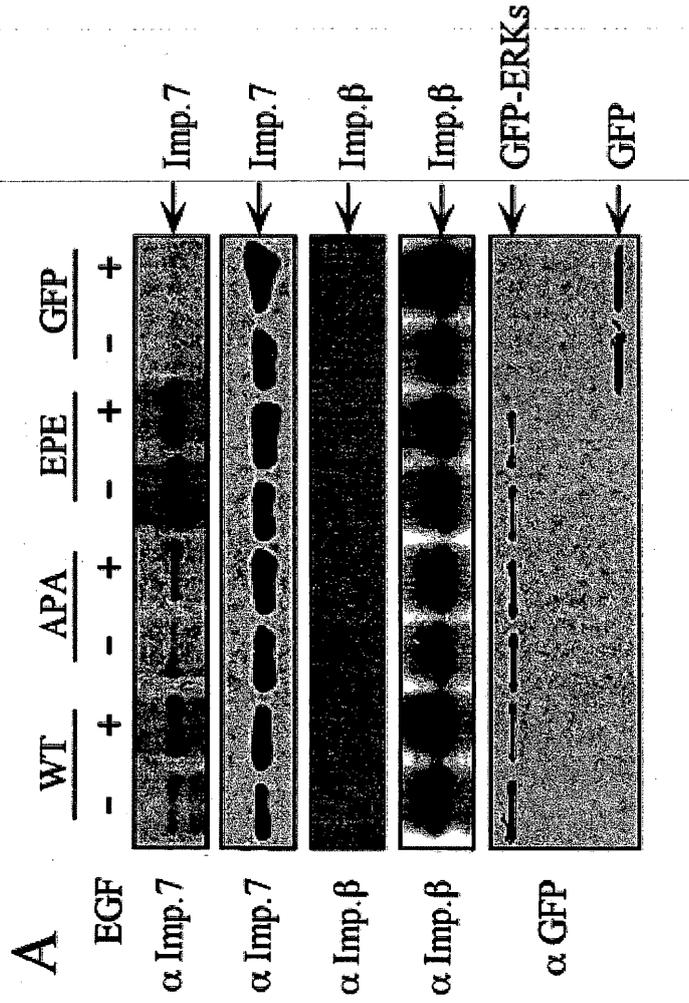


FIG. 19A



FIGs. 19B-C

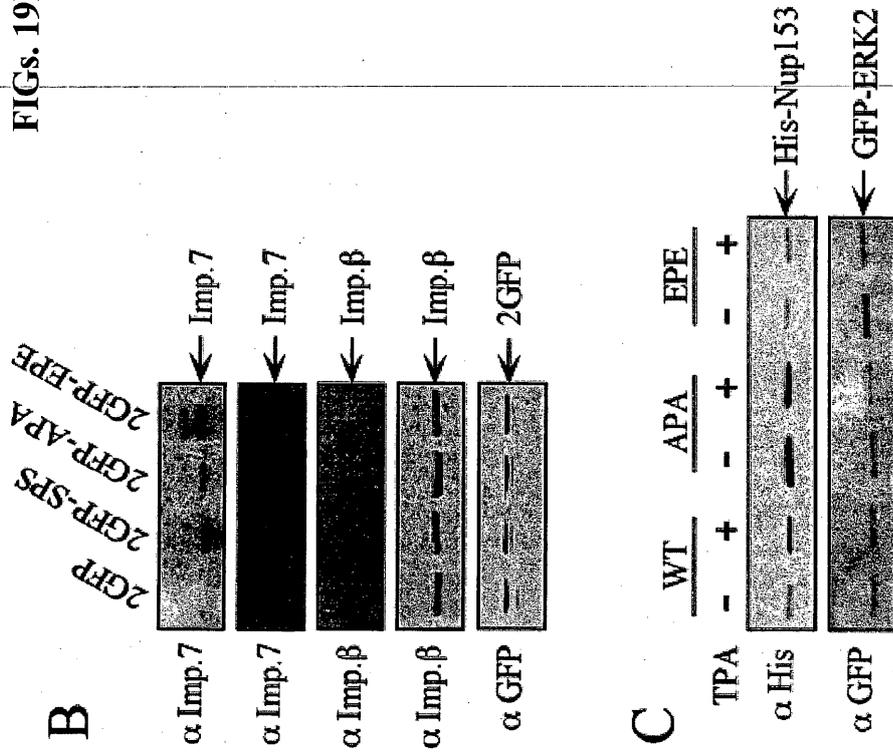


FIG. 20

SMAD3	LQWLDKVLTVMGSPSIRC	404-421
	: : : : : : : : :	
ERK2	LDQLNHILGILGSPSQED	232-249
	: : : : : :	
MEK1	WLCSTIGLNQPSPTTHAA	374-391