(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 671 002**

(51) Int. CI.:

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/IL2014/050376**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174520**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14788545 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2989119**

(54) Título: **Uso de péptidos inhibidores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

(30) Prioridad:

25.04.2013 US 201361815805 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2018

(73) Titular/es:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD. (100.0%)
at the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL

(72) Inventor/es:

SEGER, RONY y
ZEHORAI, ELDAR

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Uso de péptidos inhibidores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

La presente descripción se refiere a péptidos que se pueden utilizar para evitar la translocación nuclear de proteínas que se asocian de forma natural con Imp7 como un medio para la translocación al núcleo. Los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias e inmunitarias. Adicionalmente, los péptidos se pueden utilizar para promover la translocación nuclear de proteínas y otros compuestos al núcleo celular cuando se unen a los mismos.

Para garantizar un funcionamiento celular preciso, la distribución espacial de las proteínas debe estar estrechamente regulada y coordinada. Esto es particularmente evidente en muchas proteínas de señalización que cambian dinámica y rápidamente su localización tras la estimulación extracelular. Para mantener dicha regulación, el núcleo está separado del citoplasma mediante una envoltura de doble membrana que permite la entrada selectiva de proteínas a través de complejos de poro nuclear (NPC) especializados. La selectividad de la localización nuclear está principalmente mediada por una señal de localización nuclear (NLS) albergada dentro de la secuencia de la proteína nuclear [G. Schlenstedt, FEBS Lett 389, 75 (24 de junio, 1996)].

El principal tipo de NLS identificado hasta el momento se compone de aminoácidos alcalinos que se requieren para el mecanismo de entrada a través del NPC. Estas secuencias alcalinas vienen en dos opciones: (i) un tramo simple de cinco a seis aminoácidos alcalinos, ilustrado por la NLS del antígeno T grande del virus de simio (SV) 40; y (ii) una NLS bipartita compuesta por dos aminoácidos alcalinos, una región espaciadora de 10-12 aminoácidos y una agrupación en la que tres de los cinco aminoácidos deben ser alcalinos. Este tipo está tipificado por la nucleoplasmina. Para que se produzca la importación nuclear mediada por la NLS, la NLS se asocia primero con las proteínas receptoras de importación citosólica importina α y β, lo que permite el acoplamiento en el lado citoplasmático del poro nuclear [E. J. Tran, S. R. Wente, Cell 125, 1041 (16 de junio, 2006)]. El movimiento a través del poro nuclear está regulado por la pequeña GTPasa Ran, que en su estado unido a GTP promueve la disociación de la proteína importada desde las importinas y su reciclado de vuelta al citoplasma [J. Moroianu, J Cell Biochem Supl 32-33, 76 (1999))].

Sin embargo, no todas las proteínas lanzadera citonucleares 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 proteínas pequeñas (<30-40 kDa), distintos motivos de direccionamiento nuclear [D. Christophe, C. Christophe-Hobertus, B. Pichon, Cell Signal 12, 337 (mayo, 2000)], la interacción con proteínas que contienen NLS o, alternativamente, la interacción directa con las proteínas de poro nuclear (NUP); [L. Xu, J. Massague, Nat Rev Mol Cell Biol 5, 209 (marzo, 2004)]. Sin embargo, la cinética de lanzadera y retención nuclear por estos mecanismos suele ser demasiado lenta para permitir la transcripción transitoria oportuna y, por lo tanto, los mecanismos moleculares que permiten la translocación independiente de NLS rápida e irreversible de las proteínas de señalización tras la estimulación siguen siendo poco claros.

Chuderland et al., 2008, Mol Cell 31, 850-861 y Plotnikov et al., 2011, Mol Cell Biol 31, 3515-3530 ilustran que la translocación ERK1/2 implica la fosforilación mediada por CK2 de dos residuos de Ser dentro de una señal de translocación nuclear (NTS) de ERK1/2. Esta fosforilación permite la interacción con Imp7, lo que facilita aún más el transporte de ERK1/2 a través de los poros nucleares.

La capacidad de regular la localización celular de un componente biológico es importante para muchas funciones tales como la regulación de la expresión de ácidos nucleicos, la transfección de células eucarióticas, la terapia génica, la protección contra productos químicos tóxicos y el transporte de agentes anticancerosos. Por lo tanto, existe una necesidad ampliamente reconocida de identificar secuencias novedosas capaces de regular la translocación nuclear, y sería muy ventajoso identificarlas.

La técnica anterior adicional incluye la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 20100099627.

XIAOWEI GONG ET AL, describen "Mecanismos que regulan la translocación nuclear de MAP quinasa p38", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, US, (20100512), vol. 110, núm. 6, páginas 1420 - 1429.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1 (PERYQNLSPV), comprendiendo el péptido una actividad de direccionamiento nuclear, siendo el péptido no más largo de 20 aminoácidos, siendo el péptido capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α.

Preferiblemente, el péptido aislado comprende la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 8.

Preferiblemente, el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 (PERYQNLSPVG), SEQ ID NO: 3 (PERYQNLSPVGS), SEQ ID NO: 4 (PERYQNLSPVGSG) y SEQ ID NO: 5 (PERYQNLSPVGSGA), SEQ ID NO: 6 (KPERYQNLSPVGSGA) y SEQ ID NO: 7 (KPERYQNLSPVAAAA).

Preferiblemente, el péptido aislado está miristoilado.

Preferiblemente, el péptido aislado es para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o un trastorno inmunitario.

Preferiblemente, dicho trastorno inmunitario es un trastorno autoinmunitario.

Preferiblemente, dicho trastorno inflamatorio es colitis.

Preferiblemente, dicho trastorno inflamatorio es cáncer.

La presente invención se refiere también a una composición de materia que comprende el péptido aislado y una sustancia heteróloga unida a dicha secuencia de aminoácidos a través de un conector.

La presente invención se refiere también a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido.

La presente invención se refiere también a una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado.

La presente invención se refiere también a un método ex vivo de direccionamiento de una sustancia a un núcleo de una célula anfitriona, comprendiendo el método la introducción de la sustancia en la célula anfitriona, estando la sustancia unida al péptido.

La presente invención se refiere también a un método ex vivo de direccionamiento de una sustancia a un núcleo de una célula anfitriona, comprendiendo el método la introducción del péptido en la célula anfitriona, estando dicho péptido unido a un radical de afinidad capaz de unirse a la sustancia.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende como agente activo el péptido y un portador farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Algunos aspectos de la descripción se describen en la presente memoria, a título de ejemplo solamente, con referencia a las imágenes adjuntas. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a título de ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de los aspectos de la descripción. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica los aspectos de la descripción.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-B ilustran que JNK1/2 y p38α/β interactúan con Imp3, 7 y 9 en células HeLa. (A) Estudios de Co-IP. Las células HeLa se cultivaron hasta una confluencia de 70%, se privaron de suero (FBS al 0,1%, 16 horas) y a continuación se estimularon con Anisomicina (Anis; 0,5 µg/ml, 15 min) y TPA (250 nM, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se sometieron después a Co-IP con Ab anti JNK1, JNK2, p38α, p38β o IgG de conejo como control negativo (Control). Las Imp que interaccionaban se detectaron mediante transferencia Western con los Ab anti-Imp indicados. La cantidad de MAPK InmunoPrecipitadas se detectó mediante los Ab anti-JNK1, JNK2, p38α y p38β o IgG de control según se indique (paneles inferiores). Las transferencias se desarrollaron con NBT/BCIP o ECL. Las flechas indican las Imp que interactúan. (B) Estudios utilizando PLA. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta una confluencia de 70%, se privaron de suero, y a continuación se estimularon con Anisomicina (Anis) o se dejaron sin tratar (NT). Las células se fijaron, y se sometieron a un ensayo PLA de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando los Ab anti-Imp junto con anti-JNK (panel superior) o anti-p38 (panel inferior) según se indique. Los núcleos se detectaron utilizando DAPI, y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia. La cuantificación de la intensidad de la señal se realizó utilizando la herramienta de análisis ImageJ (los datos mostrados representan la media ± E.T. p <0,0001 (tratado frente a control)).

Las FIG. 2A-C ilustran que Imp3, 7 y 9 son necesarias para la translocación de JNK y p38 y la transcripción inducida. (A) Los ARNip de Imp3, 7, 9, pero no de Imp5, inhiben la translocación nuclear de JNK y p38 estimulada. Las células HeLa se cultivaron sobre cubreobjetos hasta una confluencia del 30%. Los ARNip de las Imp indicadas y el ip de Control suministrados por la empresa (Scr ip, control negativo) se transfectaron a las células utilizando Dharmafect de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se privaron de suero, a continuación se estimularon con anisomicina (0,5 µg/ml, 15 minutos) o se dejaron sin tratar (NT) según se indique. Las células se fijaron a continuación, se tiñeron utilizando los Ab anti - MAPK indicados (izquierda) y se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia. (B) Cuantificación de la localización nuclear de JNK/p38 antes y después de la estimulación. Los datos mostrados representan la media ± E.T. La significacion de Imp3 frente a Imp7/Imp9 (*) fue p <0,0003. La significación de Imp3/7/9 estimuladas *vs* Scr fue p <0,00001 (C) El ARNip de Imp3, 7, 9 inhibe la activación de las dianas del factor de transcripción aguas abajo de JNKs/p38s. Las células HeLa se transfectaron con ARNip de las Imp indicadas e ip de control suministrado por el fabricante (Scr ip, control negativo) utilizando Dharmafect de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de

la transfección, las células se privaron de suero, y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml) durante los tiempos indicados o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se sometieron a un análisis de transferencia Western con Ab anti- pJUN, pMEF2A, pATF2, Imp indicadas, y tubulina.

Las FIG. 3A-B ilustran que JNK1/2 y p38α/β interactúan directamente con Imp7 o Imp9 pero no con Imp3. (A) Interacción in vitro de JNK1/2 y p38α/β con Imp3/7/9. Las Imp3/7/9 purificadas se prepararon por IP de la siguiente manera: las células HeLa se cultivaron a 70% de confluencia, se privaron de suero, y a continuación se estimularon con Anisomicina (Anis 0,5 µg/ml, 15 min), TPA (250 nM, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). Las Imp3/7/9 se InmunoPrecipitaron a continuación a partir de los extractos de la célula y se lavaron exhaustivamente, dos veces con tampón RIPA y una vez con LiCl 0,5M. Las GST-MAPK indicadas se prepararon a partir de bacterias como se describe en Materiales y métodos. Para examinar la asociación, se incubaron 500 ng de cada GST-MAPK con 20 µl de las Imp InmunoPrecipitadas indicadas en PBS (2 horas, 4°C, con rotación). Después, las esferas se lavaron con tampón de lavado que contenía NaCl 150 mM, y las MAPK que interactuaban se detectaron utilizando análisis de transferencia Western con los Ab indicados. (B) Imp3 no es necesaria para las interacciones de Imp7/9 con JNK1/2 y p38α/β. Las células HeLa se trataron con ARNip de Imp3 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se privaron de suero, y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml) o TPA (TPA 250 ng) o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se sometieron a continuación a Co-IP con anti Imp7 o Imp9, las MAPK que interactuaban se detectaron mediante transferencia Western con los Ab indicados. La cantidad de Imp InmunoPrecipitada se detectó mediante los Ab indicados.

Las FIG. 4A-B ilustran que un péptido miristoilato derivado de los aminoácidos 21-33 de p38α inhibe la translocación nuclear dependiente de estímulos y la interacción de JNK1/2 y p38α/β con Imp7. (A) El péptido inhibe la translocación nuclear dependiente de estímulos de JNK1/2 y p38α/β. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta una confluencia de 70%, se privaron de suero (FBS al 0,1%, 16 horas) y a continuación se incubaron con el péptido inhibidor (péptido, 10 µM) o péptido de control negativo "scrambred" (péptido Scr, 10 µM). Las células se trataron después con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml) o se dejaron sin tratar (NT). Las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos anti JNK1, JNK2, p38α o p38β según se indique, y DAPI para detectar núcleos. Los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia. (B) El péptido inhibe la interacción de JNK1/2 y p38α/β con Imp7. Las células HeLa se cultivaron a 70% de confluencia, se privaron de suero (FBS al 0,1%, 16 horas) y a continuación se incubaron con el péptido inhibidor (péptido, 10 µM), péptido de control negativo (péptido Scr, 10 µM) o DMSO, seguido de tratamiento con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml) o control simulado (NT). Los extractos celulares se sometieron a continuación a Co-IP con Ab anti JNK1, JNK2, p38α, p38β. La interacción de Imp7 se detectó mediante transferencia Western con los Ab anti Imp indicados. La cantidad de MAPK InmunoPrecipitadas se detectó por medio de los anticuerpos anti JNK1, JNK2, p38α y p38β según se indique.

Las FIG. 5A-D ilustran que Imp3 interactúa con el dímero de Imp7/9-MAPK de una manera fosfo-dependiente (A) Detección de la heterodimerización de Imp3/7/9 utilizando PLA. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta 70% de confluencia, se privaron de suero, y se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml, 15 min). A continuación, las células se fijaron y se sometieron a un PLA, utilizando los Ab indicados en la parte superior. Los núcleos se detectaron utilizando DAPI, y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia. (B) La cuantificación de la intensidad de la señal se realizó utilizando la herramienta de análisis ImageJ. Los datos mostrados representan la media ± E.T. La significación de las estimuladas *vs* NT fue p <0,0005. (C) Detección de la interacción Imp3/7/9 mediante CoIP. Las células HeLa privadas de suero (FBS al 0,1%, 16 horas) se trataron con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml) o TPA (250 nM) durante 15 minutos. Los extractos celulares se sometieron a continuación a una Co-IP con los Ab indicados a la derecha. Las transferencias de las CoIP y las Imp InmunoPrecipitadas (paneles inferiores) se desarrollaron con los Ab indicados a la izquierda con NBT/BCIP o ECL. (D) La interacción de Imp3 con respecto a Imp7/9 depende de la fosforilación de Imp3. Se preparó Imp3 purificada mediante IP de la siguiente manera: las células HeLa se cultivaron a una confluencia de 70%, se privaron de suero, y a continuación se estimularon con TPA (250 nM, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). La Imp3 se InmunoPrecipitó a continuación a partir de los extractos celulares y se lavó exhaustivamente, dos veces con tampón RIPA y una vez con LiCl 0,5M. Después, la proteína purificada se incubó con fosfatasa intestinal de ternera (CIP, 1 h, 37°C) o se dejó sin tratar. Se incubaron 500 ng de las Imp recombinantes indicadas con la Imp3 IP (2 horas, 4°C, con rotación). Después, las esferas se lavaron con un tampón de lavado que contenía NaCl 150 mM, y se detectaron los Imp que interactuaban utilizando análisis de transferencia Western con los Ab indicados.

Las FIG. 6A-B ilustran que p38 y JNK forman complejos con dímeros de Imp3/7 o Imp3/9 después de la estimulación. (A) Los estudios de filtración en gel revelan un desplazamiento de PM de Imp3/7/9 tras la estimulación. Las células HeLa se privaron de suero y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml, 15 min) y TPA (250 nM, 15 min), o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares (20 mg de cada tratamiento) se cargaron en una columna de exclusión por tamaño 16/60 superdex 200 (velocidad de 1 ml/min), y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones se analizaron después utilizando transferencia Western con los Ab anti Imp3/7/9 indicados a la izquierda. (B) La CoIP confirma la asociación de JNK y p38 con dímeros de Imp en los picos de ~280 kDa, pero no en los picos de ~120 kDa. Las fracciones que representan los picos de ~280 kDa y ~ 120 kDa (fracciones Núm. 9 y 22), de cada una de las columnas no tratadas, estimuladas con Anis o TPA, se sometieron a CoIP con los Ab indicados (derecha). Las proteínas que interactuaban se detectaron utilizando análisis de transferencia de Western con los Ab indicados (izquierda).

Las FIG. 7A-B ilustran que JNK1/2 y p38α/β se traslocan al núcleo independientemente de su fosforilación activadora. (A) Translocación nuclear de JNK1/2 y p38α/β. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta una confluencia de 70%, se privaron de suero (FBS al 0,1%, 16 h) y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml) y TPA (250 nM) durante los puntos temporales indicados o se dejaron sin tratar (NT). Las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos anti JNK1, JNK2, p38α o p38β según se indique, y DAPI para detectar los núcleos. Los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40). (B) La translocación nuclear de JNK1/2 y p38α/β endógenas es independiente de su fosforilación. Las células HeLa se cultivaron a 70% de confluencia, se privaron de suero, y a continuación se estimularon con anisomicina (0,5 µg/ml) o TPA (250 nM) durante los puntos temporales indicados. Los extractos celulares se produjeron y se sometieron a análisis de transferencia Western con los Ab indicados. Las transferencias se desarrollaron con NBT/BCIP o ECL.

Las Fig. 8A-B ilustran que JNK1/2 y p38α/β se traslocan al núcleo en células MCF10A y HB2. (A, B) Translocación nuclear de JNK1/2 y p38α/β en células MCF10A y HB2. (A) Se cultivaron células HB2 y (B) MCF10A en portaobjetos hasta una confluencia de 70%, se privaron de suero y se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml) o TPA (250 nM, solo para HB2). Las células se fijaron y se tiñeron utilizando Ab anti JNK y p38 según se indique en la parte superior. Los núcleos se detectaron utilizando DAPI, y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40).

La FIG. 9 ilustra que JNK1/2 y p38α/β se traslocan al núcleo utilizando un mecanismo independiente de NTS. Las mutaciones en la región homóloga de NTS no afectan el transporte nuclear de JNK1/2 y p38α/β. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta una confluencia de 70%, se transfectaron con JNK1-GFP (wt-JNK1), JNK2-GFP (wt-JNK2), p38α-GFP (wt-p38α) o p38β-GFP (wt-p38β) y sus mutantes (APA o EPE). Dieciséis horas después de la transfección, las células se privaron de suero, se fijaron y visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40).

Las FIG. 10A-B ilustran que JNK1/2 p38α/β endógenas y expresadas de manera anormalmente alta CoIP con Imp3, 7 y 9. (A) Un escrutinio de Co-IP para detectar las importinas que interactúan con JNK1/2 y p38α/β en células MCF7. Las células MCF7 se cultivaron en portaobjetos hasta 70% de confluencia, se privaron de suero y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml, 15 min), TPA (250 nM, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se sometieron a continuación a Co-IP con anti JNK1, JNK2, p38α o p38β, e IgG de conejo como control negativo (Control). Las Imp que interactuaban o las MAPK InmunoPrecipitadas se detectaron mediante transferencia Western con los Ab para Imp o MAPK indicados. (B) Interacción de las MAPK expresadas de manera anormalmente alta en células HeLa. Las células HeLa se transfectaron con JNK2-GFP (wt-JNK2), p38ββ-GFP (wt-p38β) o GFP solo. Las células se privaron de suero, y a continuación se trataron con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml, 15 min), TPA (250 nM, 15 min). Los extractos celulares se sometieron a continuación a una CoIP con Ab anti GFP. Las Imp que interactuaban y los extractos de carga se detectaron utilizando análisis de transferencia de Western con los Ab indicados (izquierda). Las transferencias se desarrollaron con NBT/BCIP o ECL. Las flechas indican las Impque interactuaban.

La FIG. 11 ilustra que la reducción de la expresión "knockdown" de Imp3/9 no tuvo efecto sobre la fosforilación del sustrato de ERK cMyc. El ARNip de Imp3, 9 no inhibió la activación de las dianas del factor de transcripción aguas abajo de ERK1/2. Las células HeLa se transfectaron con ARNip de las Imp indicadas e ip de control suministrado por el fabricante (Scr ip, control negativo) utilizando Dharmafect de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se privaron de suero, y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml) durante los puntos temporales indicados o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se sometieron a un análisis de transferencia Western con los Ab indicados, las transferencias se desarrollaron con NBT/BCIP o ECL.

Las FIG. 12A-B ilustran la translocación Imp3/7/9 en respuesta a estímulos. Las células HeLa (A) o HB2 (B) se cultivaron en portaobjetos hasta 70% de confluencia, se privaron de suero, y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). Las células se fijaron y tiñeron utilizando los Ab indicados. Los núcleos se detectaron utilizando DAPI y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40).

La FIG.13 ilustra que se requiere Ran para la translocación nuclear de JNK1/2 y p38α/β. El ARNip de Ran inhibe la translocación nuclear de JNK1/2 y p38α/β dependiente de estímulos. Las células HeLa se cultivaron en cubreobjetos a una confluencia de 30%. A continuación en ARNip de Ran y el ip de Control suministrado por la empresa (Scr ip, control negativo) se transfectaron a las células utilizando Dharmafect de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se privaron de suero, a continuación se estimularon con anisomicina (0,5 µg/ml, 15 minutos) o se dejaron sin tratar (NT) según se indique. Las células se fijaron a continuación, se tiñeron utilizando los anticuerpos anti MAPK indicados y se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40).

Las FIG. 14A-C ilustran la identificación del sitio de interacción de p38α con Importina 7. (A) representación esquemática de la mutación por truncamiento de p38α. (B) La mutación por deleción del N terminal de p38 α inhibe su translocación nuclear. Las mutaciones por deleción terminal ΔC (40a.a) o ΔN (20 o 30a.a) de p38α-GFP se

construyeron y transfectaron a células HeLa. Dieciséis horas después de la transfección, las células se privaron de suero, se estimularon con anisomicina (0,5 µg/ml, 15 minutos), o se dejaron sin tratar (NT). Las células se fijaron, los núcleos se detectaron utilizando DAPI y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40). (C) La mutación por deleción del terminal N de p38α inhibe su interacción con Imp7/9. Se construyeron mutaciones de deleción consecutivas del extremo N de p38α-GFP y se transfectaron a células HeLa. Dieciséis horas después de la transfección, las células se privaron de suero, se estimularon con anisomicina (0,5 µg/ml, 15 minutos), o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos de células se sometieron a continuación a una CoIP con anticuerpos anti GFP. La Imp7 que interactuaba y los extractos de carga se detectaron utilizando análisis de transferencia Western con los Ab indicados (izquierda). Las transferencias se desarrollaron con NBT/BCIP o ECL. Las flechas indican las Imp que interactuaban.

Las FIG. 15A-B ilustran que las MAPK de JNK (Figura 15A) y p38 (Figura 15B) forman complejos tras la estimulación. Las células HeLa se privaron de suero y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml, 15 min), TPA (250 nM, 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se cargaron en una columna de exclusión por tamaño 16/60 superdex 200 (velocidad de flujo 1 ml/min), y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones se analizaron a continuación, utilizando transferencia Western con los Ab anti JNK/p38, según se indique. Las transferencias se desarrollaron con NBT/BCIP o ECL.

La FIG.16 ilustra la distribución intracelular y la estabilidad del péptido miristoilado. Las células HeLa se cultivaron en cubreobjetos hasta 70% de confluencia, se privaron de suero (FBS al 0,1%, 16 horas) y el péptido tratado se conjugó con ácido mirístico en su extremo N y con biotina en su extremo C durante los tiempos indicados. Las células se fijaron con PFA al 3% y se tiñeron con Avidina-FITC y DAPI. El péptido se visualizó utilizando un microscopio de fluorescencia (aumento x40).

Las FIG. 17A-C ilustran el uso del péptido inhibidor como agente terapéutico potencial en el modelo de colitis. Se trataron 21 ratones macho C57BL (I.V. cada 48 horas) con péptido (15 mg/Kilo), péptido de control negativo (15 mg/Kilo) o DMSO (2%). La colitis fue inducida utilizando DSS (1,25% en agua potable) y los ratones fueron sacrificados 7 días después de la inducción. (A-C). La colitis se evaluó mediante imágenes endoscópicas y se calificó por el número de lesiones en el colon y el peso de los ratones.

Las FIG. 18A-B ilustran que el péptido miristolado bloquea la interacción de p38 con Importina 7. (A) El péptido miristiolado se modificó (reemplazo de 3 residuos por alanina) Myr-KPERYQNLSPVGSGA - SEQ ID NO: 9; Myr-KPERYQNLSPVAAAA - SEQ ID NO: 10. (B) Las células Hela se preincubaron con péptido modificado (2 horas) y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml, 15 min) o se dejaron sin tratar. Los extractos celulares se sometieron a continuación a CoIP con anti p38a. La interacción de Imp7 o p38 InmunoPrecipitado se detectaron mediante transferencias Western con los Ab indicados.

Las FIG. 19A-C ilustran que los péptidos miristoilados inhiben la translocación nuclear dependiente de estimulación de p38. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta 70% de confluencia, se privaron de suero y se preincubaron con péptido nuevo (NP), péptido o péptido de control negativo y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml 15 min) o se dejaron sin tratar (NT) . Las células se fijaron y tiñeron utilizando los Ab indicados. Los núcleos se detectaron utilizando DAPI y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio confocal de disco giratorio (Zeiss, aumento x100).

Las FIG. 20A-C ilustran que los péptidos miristoilados inhiben la translocación nuclear dependiente de estimulación de JNK. Las células HeLa se cultivaron en portaobjetos hasta 70% de confluencia, se privaron de suero y se preincubaron con péptido nuevo (NP), péptido o péptido de control negativo y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml 15 min) o se dejaron sin tratar (NT). Las células se fijaron y tiñeron utilizando los Ab indicados. Los núcleos se detectaron utilizando DAPI y los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio confocal de disco giratorio (Zeiss, aumento x100).

La FIG.21 ilustra que los péptidos miristoilados no afectaron a la activación de MAPK dependiente de estimulación. Las células HeLa se cultivaron a 70% de confluencia, se privaron de suero y se preincubaron con péptido nuevo (NP), péptido o péptido de control negativo y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis 0,5 µg/ml), TPA (250 nM) o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares se produjeron y se sometieron a análisis de transferencia Western con los Ab indicados.

Descripción de los aspectos específicos de la invención

La presente descripción, en algunos aspectos de la misma, se refiere a péptidos que se pueden utilizar para evitar la translocación nuclear de proteínas que se asocian de forma natural con Imp7 como un medio para la translocación al núcleo. Los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y relacionadas con la inmunidad. Adicionalmente, los péptidos se pueden utilizar para promover la translocación nuclear de proteínas y otros compuestos al núcleo celular cuando se unen a los mismos.

Los principios y el funcionamiento de la señal de localización nuclear de acuerdo con la presente descripción se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos un aspecto de la descripción en detalle, se debe entender que la descripción no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La descripción es susceptible de otros aspectos o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras. Asimismo, se debe entender que la fraseología y la terminología empleadas en la presente memoria tienen como objeto la descripción y no se deben considerar limitantes.

JNK y p38 son miembros de la familia de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). En mamíferos, existen tres isoformas de JNK (JNK1-3) y cuatro de p38 (p38α-δ) que regulan una gran cantidad de procesos celulares, que incluyen principalmente respuestas al estrés.

Los autores de la presente invención estudiaron la translocación nuclear estimulada de JNK1/2 y p38α/β, y descubrieron que los cuatro se translocaban rápidamente al núcleo tras estimulaciones por estrés y mitogénicas. Los resultados experimentales obtenidos por los autores de la presente invención sugieren que cada uno de JNK1/2 y p38α/β son liberados de sus anclas citoplasmáticas mediante un mecanismo independiente de la activación. Esto permite la unión de MAPK activas o inactivas a Imp7 o Imp9, unidas a Imp3. Los dímeros Imp3/Imp7 o Imp3/Imp9 escoltan a continuación las MAPK ancladas a la envoltura nuclear, donde permanece Imp3, mientras que Imp7/9 penetra más a través del poro nuclear. Es probable que el complejo MAPK/Imp sea disociado después por GTP-Ran, que libera las MAPK en el núcleo.

Los autores de la presente invención acometieron a continuación la identificación del sitio en JNK y p38 que media la interacción con Imp7 e Imp9 y mostraron que la secuencia importante se encuentra dentro de los residuos 20-30 de p38α (Figuras 14A-C).

Mientras se reduce la presente descripción a la práctica, los autores de la presente invención sintetizaron un péptido miristoilado de 14 aminoácidos basado en la secuencia de residuos 21-34 de p38α y mostraron que cuando se aplicaba a células HeLa antes de la estimulación, impedía la translocación nuclear (Figura 4A), y las interacciones Imp7/9 (Figura 4B) de las MAPK examinadas.

Dado que los péptidos de la presente descripción son capaces de inhibir específicamente las actividades nucleares de JNK1/2 y P38 α/β sin modular sus actividades citoplásmicas, estos péptidos se pueden utilizar para inhibir las actividades nucleares de JNK1/2 y P38 α/β (p.ej., actividad apoptótica, actividades inflamatorias) sin dañar otras actividades citoplásmicas relacionadas con JNK1/2 y P38 α/β en las células. Por lo tanto, los péptidos de este aspecto de la presente descripción pueden servir como agente terapéutico para enfermedades inflamatorias y relacionadas con la apoptosis sin tener los efectos secundarios de otros inhibidores de JNK1/2 y p38 α/β.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1, comprendiendo el péptido aislado una actividad de direccionamiento nuclear, no teniendo el péptido más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2, comprende una actividad de direccionamiento nuclear, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3, comprende una actividad de direccionamiento nuclear y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4, comprende una actividad de direccionamiento nuclear, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 5, comprende una actividad de direccionamiento nuclear y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 6, comprende una actividad de direccionamiento nuclear y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 7, comprende una actividad de direccionamiento nuclear, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 8, comprende una actividad de direccionamiento nuclear y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1, el péptido aislado capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, teniendo el péptido no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 5, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 6, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 7, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 8, es capaz de prevenir siendo el péptido aislado capaz de prevenir la translocación nuclear de P38α, y tiene no más de 20 aminoácidos de longitud.

Como se menciona, los péptidos de acuerdo con este aspecto de la presente descripción tienen preferiblemente no más de 20 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 19 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 18 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 17 aminoácidos de longitud .

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 16 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 15 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 14 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 13 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 12 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 11 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un aspecto concreto, los péptidos tienen 10 aminoácidos de longitud.

Más preferiblemente, la homología con SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente descripción es 81 por ciento, más preferiblemente 82 por ciento, más preferiblemente 83 por ciento, más preferiblemente 84 por ciento, más preferiblemente 85 por ciento, más preferiblemente 86 por ciento, más preferiblemente 87 por ciento, más preferiblemente 88 por ciento, más preferiblemente 89 por ciento, más preferiblemente 90 por ciento, más preferiblemente 91 por ciento, más preferiblemente 92 por ciento, más preferiblemente 93 por ciento más preferiblemente 94 por ciento, más preferiblemente 95 por ciento, más preferiblemente 96 por ciento, más preferiblemente 97 por ciento, más preferiblemente 98 por ciento, más preferiblemente 99 por ciento, y lo más preferiblemente 100 por ciento.

De acuerdo con un aspecto, el péptido de la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

De acuerdo con otro aspecto más, el péptido de la presente descripción consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Un porcentaje de homología o identidad de un polipéptido de muestra con un polipéptido de referencia, tal como el del péptido de direccionamiento nuclear de la presente descripción con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1, 2 3, 4, 5, 6, 7 u 8 se puede determinar de varias maneras. Preferiblemente, el porcentaje de homología o identidad entre polipéptidos se determina utilizando el soporte lógico de proteína-proteína convencional BLAST [blastp] del NCBI.

Los autores de la presente invención contemplan que la secuencia de aminoácidos de los péptidos descritos en la presente memoria pueda ser sustituida de forma conservativa o no conservativa.

El término "sustitución conservativa" según se utiliza en la presente memoria, se refiere al reemplazo de un aminoácido presente en la secuencia nativa en el péptido por un aminoácido natural o no natural o un peptidomimético que tiene propiedades estéricas similares. Cuando la cadena lateral del aminoácido nativo que se vaya a reemplazar sea polar o hidrófoba, la sustitución conservativa debería ser con un aminoácido natural, un aminoácido no natural o con un radical peptidomimético que también sea polar o hidrófobo (además de tener las mismas propiedades estéricas que la cadena lateral del aminoácido reemplazado).

Dado que los aminoácidos naturales se agrupan típicamente de acuerdo con sus propiedades, las sustituciones conservativas por aminoácidos naturales pueden determinarse fácilmente teniendo en cuenta el hecho de que, de acuerdo con la descripción, se considera el reemplazo de aminoácidos cargados por aminoácidos no cargados estéricamente similares como sustituciones conservativas.

Para producir sustituciones conservativas por aminoácidos no naturales, también es posible utilizar análogos de aminoácidos (aminoácidos sintéticos) bien conocidos en la técnica. Un peptidomimético del aminoácido de origen natural está bien documentado en la bibliografía conocida por el experto en la técnica.

Al afectar a las sustituciones conservativas, el aminoácido sustituyente debería tener el mismo grupo funcional o uno similar en la cadena lateral que el aminoácido original.

La expresión "sustituciones no conservativas" según se utiliza en la presente memoria se refiere al remplazo del aminoácido presente en la secuencia parental por otro aminoácido natural o no natural que tiene diferentes propiedades electroquímicas y/o estéricas. Por lo tanto, la cadena lateral del aminoácido sustituyente puede ser significativamente más grande (o más pequeña) que la cadena lateral del aminoácido nativo que está siendo sustituido y/o puede tener grupos funcionales con propiedades electrónicas significativamente diferentes que las del aminoácido que se sustituye. Los ejemplos de sustituciones no conservativas de este tipo incluyen la sustitución de fenilalanina o cicohexilmetilglicina por alanina, isoleucina por glicina o -NH-CH[(-CH_2)$_5$-COOH]-CO- por ácido aspártico. Esas sustituciones no conservativas que caen dentro del alcance de la presente descripción son las que todavía constituyen un péptido que tiene propiedades antibacterianas.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "actividad de direccionamiento nuclear" se refiere a la capacidad del péptido para aumentar su razón de localización nuclear:citoplasmática, o un agente unido a éste, en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 20% e incluso más preferiblemente por al menos 30%, 50%, 80% o más.

La actividad de direccionamiento nuclear puede detectarse por medios directos o indirectos: la observación directa mediante fluorescencia o microscopía de barrido con láser confocal es posible cuando el péptido de direccionamiento nuclear está marcado con un colorante fluorescente (los kits de marcaje están disponibles comercialmente, p.ej., de Pierce o Molecular Probes). La actividad de direccionamiento nuclear también puede evaluarse mediante microscopía electrónica si el péptido de direccionamiento nuclear está marcado con un material denso a los electrones, tal como el oro coloidal (Oliver, Methods Mol. Biol. 115 (1999), 341-345).

Se apreciará que si el péptido de direccionamiento nuclear está unido a un agente heterólogo (p.ej., un polinucleótido), en ese caso la actividad puede detectarse observando la ubicación del agente heterólogo.

La actividad de direccionamiento nuclear puede evaluarse de maneras indirectas si la molécula unida (p.ej., ácido nucleico) ejerce una función en el núcleo. Esta función puede ser, por ejemplo, la expresión de un gen codificado por el ácido nucleico unido incluyendo las consecuencias de tal expresión génica que pueden ejercerse sobre otras moléculas o procesos celulares.

El término "péptido" o "polipéptido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un polímero de aminoácidos naturales o sintéticos, que abarca péptidos nativos (productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos polipeptídicos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean incluso más estables en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células. Por lo tanto, por ejemplo, la presente descripción contempla la miristoilación del péptido. Preferiblemente, la miristoilación ocurre en el residuo N-terminal. La miristoilación es una modificación irreversible de la lipidación de proteínas en la que un grupo miristoilo, derivado del ácido mirístico, se une covalentemente mediante un enlace amida al grupo alfa-amino de un residuo N-terminal. Los ejemplos de péptidos miristoilados contemplados por la presente descripción incluyen SEQ ID NO: 9-16.

Tales modificaciones incluyen, pero no están limitadas a la modificación del extremo N, la modificación del extremo C, la modificación del enlace polipeptídico, incluyen, sin limitarse a, 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 cadena principal y modificación de residuos. 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)). A continuación se proporcionan más detalles a este respecto.

Los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido pueden estar sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH3)-CO-), enlaces éster (-C(R)HCOOC(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH2-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, p.ej., metilo, enlaces carba (-CH2-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH2-), enlaces de tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados polipeptídicos (-N(R)-CH2-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", naturalmente presente en el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden aparecer 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, pueden sustituirse por ácido sintético no natural tal como fenilglicina, TIC, naftilenina (Nol), derivados metilados en el anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

Además de lo anterior, los polipéptidos de la presente descripción también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros no aminoacídicos (p.ej., ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc.).

Según se utiliza en la presente memoria en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones a continuación, se entiende que el término "aminoácido" o "aminoácidos" incluye los 20 aminoácidos naturales; aquellos aminoácidos a menudo modificados postraduccionalmente in vivo, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye aminoácidos tanto D- como L- (estereoisómeros).

Las Tablas 1 y 2 a continuación enumeran los aminoácidos naturales (Tabla 1) y los aminoácidos no convencionales o modificados (Tabla 2) que se pueden utilizar con la presente descripción.

Tabla 1

Símbolo de una letra	***Abreviatura de tres letras***	***Aminoácido***
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparragina
D	Asp	Ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina

Símbolo de una letra	*Abreviatura de tres letras*	*Aminoácido*
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina
X	Xaa	Cualquier aminoácido anterior

Tabla 2

Código	*Aminoácido no convencional*	*Código*	*Aminoácido no convencional*
Hyp	Hidroxiprolina	Orn	ornitina
Norb	aminonorbonil-carboxilato	Abu	ácido α-aminobutírico
Cpro	aminociclopropano-carboxilato	Dala	D-alanina
Narg	N-(3-guanidinopropil)glicina	Darg	D-arginina
Nasn	N-(carbamilmetil)glicina	Dasn	D-asparragina
Nasp	N-(carboximetil)glicina	Dasp	Ácido D-aspártico
Ncys	N-(tiometil)glicina	Dcys	D-cisteína
Ngln	N-(2-carbamiletil)glicina	Dgln	D-glutamina
Nglu	N-(2-carboxietil)glicina	Dglu	Ácido D-glutámico
Nhis	N-(imidazoliletil)glicina	Dhis	D-histidina
Nile	N-(1-metilpropil)glicina	Dile	D-isoleucina
Nleu	N-(2-metilpropil)glicina	Dleu	D-leucina
Nlys	N-(4-aminobutil)glicina	Dlys	D-lisina
Nmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Dmet	D-metionina
Norn	N-(3-aminopropil)glicina	Dorn	D-ornitina

Código	*Aminoácido no convencional*	*Código*	*Aminoácido no convencional*
Nphe	N-bencilglicina	Dphe	D-fenilalanina
Nser	N-(hidroximetil)glicina	Dpro	D-prolina
Nthr	N-(1-hidroxietil)glicina	Dser	D-serina
Nhtrp	N-(3-indoliletil)glicina	Dthr	D-treonina
Ntyr	N-(*p*-hidroxifenil)glicina	Dtrp	D-triptófano
Nval	N-(1-metiletil)glicina	Dtyr	D-tirosina
Nmgly	N-metilglicina	Dval	D-valina
Nmala	L-N-metilalanina	Dnmala	D-N-metilalanina
Nmarg	L-N-metilarginina	Dnmarg	D-N-metilarginina
Nmasn	L-N-metilasparragina	Dnmasn	D-N-metilasparragina
Nmasp	ácido L-N-metilaspartic	Dnmasp	D-N-metilasparatato
Nmcys	L-N-metilcisteína	Dnmcys	D-N-metilcisteína
Nmgln	L-N-metilglutamina	Dnmgln	D-N-metilglutamina
Nmglu	Ácido L-N-metilglutámico	Dnmglu	D-N-metilglutamato
Nmhis	L-N-metilhistidina	Dnmhis	D-N-metilhistidina
Nmile	L-N-metilisoleucina	Dnmile	D-N-metilisoleucina
Nmleu	L-N-metileucina	Dnmleu	D-N-metileucina
Nmlys	L-N-metillisina	Dnmlys	D-N-metilisina
Nmmet	L-N-metilmetionina	Dnmmet	D-N-metilmetionina
Nmorn	L-N-metilornitina	Dnmorn	D-N-metilornitina
Nmphe	L-N-metilfenilalanina	Dnmphe	D-N-metilfenilalanina
Nmpro	L-N-metilprolina	Dnmpro	D-N-metilprolina
Nmser	L-N-metilserina	Dnmser	D-N-metilserina
Nmthr	L-N-metiltreonina	Dnmthr	D-N-metiltreonina
Nmtrp	L-N-metiltriptófano	Dnmtrp	D-N-metiltriptofano
Nmtyr	L-N-metiltirosina	Dnmtyr	D-N-metiltirosina

Código	*Aminoácido no convencional*	*Código*	*Aminoácido no convencional*
Nmval	L-N-metilvalina	Dnmval	D-N-metilvalina
Nmnle	L-N-metilnorleucina	Nle	L-norleucina
Nmnva	L-N-metilnorvalina	Nva	L-norvalina
Nmetg	L-N-metil-etilglicina	Etg	L-etilglicina
Nmtbug	L-N-metil-t-butilglicina	Tbug	L-t-butilglicina
Nmhphe	L-N-metil-homofenilalanina	Hphe	L-homofenilalanina
Nmanap	N-metil-α-naftilalanina	Anap	α-naftilalanina,
Nmpen	N-metilpenicilamina	Pen	penicilamina
Nmgabu	N-metil-γ-aminobutirato	Gabu	ácido γ-aminobutírico
Nmchexa	N-metil-ciclohexilalanina	Chexa	ciclohexilalanina
Nmcpen	N-metil-ciclopentilalanina	Cpen	ciclopentilalanina
Nmaabu	N-metil-α-amino-α-metilbutirato	Aabu	α-amino-α-metilbutirato
Nmaib	N-metil-α-aminoisobutirato	Aib	ácido α-aminoisobutírico
Marg	L-α-metilarginina	Dmarg	D-α-metilarginina
Masn	L-α-metilasparragina	Dmasn	D-α-metilasparragina
Masp	L-α-metilaspartato	Dmasp	D-α-metilaspartato
Mcys	L-α-metilcisteína	Dmcys	D-α-metilcisteína
Mgln	L-α-metilglutamina	Dmgln	D-α-metilglutamina
Mglu	L-α-metilglutamato	Dmglu	Ácido D-α-metil glutámico
Mhis	L-α-metilhistidina	Dmhis	D-α-metilhistidina
Mile	L-α-metilisoleucina	Dmile	D-α-metilisoleucina
Mleu	L-α-metileucina	Dmleu	D-α-metil-leucina
Mlys	L-α-metil-lisina	Dmlys	D-α-metil-lisina
Mmet	L-α-metilmetionina	Dmmet	D-α-metilmetionina
Morn	L-α-metilornitina	Dmorn	D-α-metilornitina
Mphe	L-α-metilfenilalanina	Dmphe	D-α-metilfenilalanina

Código	*Aminoácido no convencional*	*Código*	*Aminoácido no convencional*
Mpro	L-α-metilprolina	Dmpro	D-α-metilprolina
Mser	L-α-metilserina	Dmser	D-α-metilserina
Mthr	L-α-metiltreonina	Dmthr	D-α-metiltreonina
Mtrp	L-α-metiltriptófano	Dmtrp	D-α-metiltriptófano
Mtyr	L-α-metiltirosina	Dmtyr	D-α-metiltirosina
Mval	L-α-metilvalina	Dmval	D-α metilvalina
Mnva	L-α-metilnorvalina	Ncbut	N-ciclobutilglicina
Metg	L-α-metiletilglicina	Nchep	N-cicloheptilglicina
Mtbug	L-α-metil-*t*-butilglicina	Nchex	N-ciclohexilglicina
Mhphe	L-α-metil-homofenilalanina	Ncdec	N-ciclodecilglicina
Manap	α-metil-α-naftilalanina	Ncdod	N-ciclododecilglicina
Mpen	α-metilpenicilamina,	Ncoct	N-ciclooctilglicina
Mgabu	α-metil-γ-aminobutirato	Ncpro	N-ciclopropilglicina
Mchexa	α-metil-ciclohexilalanina	Ncund	N-cicloundecilglicina
Mcpen	α-metil-ciclopentilalanina	Naeg	N-(2-aminoetil)glicina
Nnbhm	N-(N-(2,2-difeniletil)carbamilmetil-glicina	Nbhm	N-(2,2-difeniletil)glicina
Nnbhe	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil-glicina	Nbhe	N-(3,3-difenilpropil)glicina
Tic	Ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico	Nmbc	1-carboxi-1-(2,2-difeniletilamino)ciclopropano
pThr	Fosfotreonina	pSer	fosfoserina
	O-metil-tirosina	pTyr	fosfotirosina
	Hidroxilisina		ácido 2-aminoadípico

Los péptidos de la presente descripción pueden comprender secuencias líder para modular la secreción de los mismos en la célula. Una secuencia líder ilustrativa puede comprender la secuencia líder TAT.

Los extremos N y C de los péptidos de la presente descripción pueden estar protegidos por grupos funcionales. Los grupos funcionales adecuados son descritos por Green and Wuts, en "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, capítulos 5 y 7, 1991. Los grupos protectores preferidos son aquellos que facilitan el transporte del compuesto unido al mismo en una célula, por ejemplo, reduciendo el carácter hidrófilo y aumentando el carácter lipófilo de los compuestos.

Estos radicales se pueden escindir *in vivo,* ya sea por hidrólisis o enzimáticamente, dentro de la célula. Los grupos protectores de hidroxilo incluyen ésteres, carbonatos y grupos protectores de carbamato. Los grupos protectores de amina incluyen grupos alcoxi y ariloxicarbonilo, como se describió anteriormente para los grupos protectores N-

terminales. Los grupos protectores de ácido carboxílico incluyen ésteres alifáticos, bencílicos y arílicos, como se describió anteriormente para los grupos protectores C-terminales. En un aspecto, el grupo ácido carboxílico en la cadena lateral de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico en un péptido de la presente descripción está protegido, preferiblemente con un éster metílico, etílico, bencílico o bencílico sustituido.

Los ejemplos de grupos protectores N-terminales incluyen grupos acilo (-CO-R1) y grupos alcoxicarbonilo o ariloxicarbonilo (-CO-O-R1), en donde R1 es un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido. Los ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo, (etil)-CO-, n-propil-CO-, iso-propil-CO-, n-butil-CO-, sec-butil-CO-, t-butil-CO-, hexilo, lauroilo, palmitoilo, miristoilo, estearilo, oleoilo, fenil-CO-, fenil-CO- sustituido, bencil-CO- y (bencil sustituido)-CO-. Los ejemplos de grupos alcoxicarbonilo y ariloxicarbonilo incluyen CH3-O-CO-, (etil)-O-CO-, n-propil-O-CO-, iso-propil-O-CO-, n-butil-O-CO -, sec-butil-O-CO-, t-butil-O-CO-, fenil-O-CO-, fenil-O-CO- sustituido y bencil-O-CO-, (bencil sustituido)-O-CO-. Adamantano, naftaleno, miristoleilo, tolueno, bifenilo, cinamoilo, nitrobenzoilo, toluoilo, furoilo, benzoilo, ciclohexano, norbornano, Z-caproico. Para facilitar la N-acilación, pueden estar presentes de uno a cuatro residuos de glicina en el extremo N-terminal de la molécula.

El grupo carboxilo en el extremo C del compuesto se puede proteger, por ejemplo, con una amida (es decir, el grupo hidroxilo en el extremo C se reemplaza por $-NH_2$, $-NHR_2$ y $-NR_2R_3$) o éster (es decir, el grupo hidroxilo en el extremo C se reemplaza por $-OR_2$). R_2 y R_3 son independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido. Además, tomados junto con el átomo de nitrógeno, R_2 y R_3 pueden formar un anillo heterocíclico C4 a C8 con aproximadamente 0-2 heteroátomos adicionales tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos de anillos heterocíclicos adecuados incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, morfolino, tiomorfolino o piperazinilo. Los ejemplos de grupos protectores C-terminales incluyen $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, -NH(etilo), $-N(etilo)_2$, -N(metil)(etilo), -NH(bencilo), -N(alquil C1-C4)(bencilo), -NH(fenilo), -N(alquil C1-C4)(fenilo), $-OCH_3$, -O-(etilo), -O-(n-propilo), -O-(n-butilo), -O-(iso-propilo), -O-(sec-butilo), -O-(t- butilo), -O-bencilo y -O-fenilo.

Los péptidos de la presente descripción también pueden comprender radicales no aminoacídicos, tales como, por ejemplo, radicales hidrofóbicos (diversos hidrocarburos y derivados de hidrocarburos lineales, ramificados, cíclicos, policíclicos o heterocíclicos) unidos a los péptidos; varios grupos protectores, especialmente cuando el compuesto es lineal, que están unidos a los extremos terminales del compuesto para disminuir la degradación. Se pueden incluir grupos químicos (no aminoacídicos) presentes en el compuesto para mejorar diversas propiedades fisiológicas tales como; disminución de la degradación o el aclaramiento; disminución de la repulsión por varias bombas celulares, mejora de las actividades inmunogénicas, mejora de diversos modos de administración (tales como la unión de varias secuencias que permiten la penetración a través de diversas barreras, a través del intestino, etc.); aumento de la especificidad, aumento de la afinidad, disminución de la toxicidad y similares.

De acuerdo con un aspecto, los péptidos de la presente descripción están unidos a un agente potenciador de la liberación sostenida. Los agentes potenciadores de la liberación sostenida ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ácido hialurónico (HA), ácido algínico (AA), poli(metacrilato de hidroxietilo) (Poli-HEMA), polietilenglicol (*PEG*), glima y poliisopropilacrilamida.

La unión del componente de la secuencia de aminoácidos de los péptidos de la descripción a otros agentes no aminoacídicos puede ser mediante enlace covalente, mediante formación de complejos no covalentes, por ejemplo, mediante formación de complejos con un polímero hidrófobo, que puede degradarse o escindirse produciendo un compuesto susceptible de liberación sostenida; atrapando la parte aminoacídica del péptido en liposomas o micelas para producir el péptido final de la descripción. La asociación puede ser mediante el atrapamiento de la secuencia de aminoácidos dentro del otro componente (liposoma, micela) o la impregnación de la secuencia de aminoácidos dentro de un polímero para producir el péptido final de la descripción.

Los compuestos de la descripción pueden ser lineales o cíclicos (la ciclación puede mejorar la estabilidad). La ciclación puede tener lugar por cualquier medio conocido en la técnica. Cuando el compuesto está compuesto predominantemente de aminoácidos, la ciclación puede ser a través de N- a C-terminal, de N-terminal a cadena lateral y de N-terminal a cadena principal, de C-terminal a cadena lateral, de C-terminal a cadena principal, de cadena lateral a cadena principal y de cadena lateral a cadena lateral, así como la ciclación de cadena principal a cadena principal. La ciclación del péptido también puede tener lugar a través de radicales orgánicos no aminoacídicos comprendidos en el péptido.

Los péptidos de la presente descripción se pueden sintetizar bioquímicamente por ejemplo utilizando técnicas convencionales de fase sólida. Estos métodos incluyen síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica. Estos métodos se utilizan preferiblemente cuando el péptido es relativamente corto (es decir, 10 kDa) y/o cuando no puede producirse mediante técnicas recombinantes (es decir, no codificado por una secuencia de ácido nucleico) y, por lo tanto, implica una química diferente.

Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y son 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 preparativa de alto rendimiento [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.] y cuya composición puede confirmarse mediante secuenciación de aminoácidos.

Las técnicas recombinantes también se pueden utilizar para generar los péptidos y/o polipéptidos de la presente descripción. Estas técnicas pueden preferirse cuando el péptido está unido 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 (p.ej., más de 20 aminoácidos) y grandes cantidades de los mismos. Tales técnicas recombinantes son 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, pág. 421-463. Los ejemplos de proteínas heterólogas se proporcionan a continuación.

Para producir un péptido y/o polipéptido de la presente descripción utilizando tecnología recombinante, se liga un polinucleótido que codifica el péptido de direccionamiento nuclear de la presente descripción a un vector de expresión de ácido nucleico, que comprende la secuencia de polinucleótidos bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora en cis (p.ej., secuencia promotora) adecuada para dirigir la transcripción constitutiva, específica de tejido o inducible de los polipéptidos de la presente descripción en células anfitrionas.

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

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótidos complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de la transcripción inversa de ARN mensajero utilizando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Tal secuencia puede ser posteriormente amplificada *in vivo* o *in vitro* utilizando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia genómica de polinucleótidos " se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una porción contigua de un cromosoma.

Según se utiliza en la presente memoria, 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 exónicas requeridas para codificar el polipéptido de la presente descripción, así como algunas secuencias intrónicas que se intercalan entre ellas. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo otros genes, e incluirán típicamente secuencias de señales de empalme conservadas. Tales secuencias intrónicas pueden incluir adicionalmente elementos reguladores de la expresión que actúan en cis.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del péptido recombinante. El vector de expresión de la presente descripción puede incluir secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o preferiblemente ambos (p.ej., vectores lanzadera). Los vectores de clonación típicos contienen secuencias de inicio de la transcripción y la traducción (p.ej., promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (p.ej., señales de poliadenilación). Se apreciará que el vector de expresión también puede comprender secuencias de polinucleótidos que codifican otros polipéptidos que están unidos transcripcionalmente a los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción. Dichos polipéptidos se describen adicionalmente a continuación en la presente memoria.

Se puede utilizar una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión del anfitrión para expresar los péptidos de la presente descripción. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contiene la secuencia codificante de polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p.ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes, tales como el plásmido Ti, que contiene la secuencia codificante del polipéptido.

Se apreciará que los polinucleótidos de la presente descripción también pueden expresarse directamente en el sujeto (es decir, terapia génica in vivo) o pueden expresarse ex vivo en un sistema celular (autólogo o no autólogo) y a continuación administrarse al sujeto. Las técnicas de terapia génica se describen más detalladamente a continuación.

Aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), la construcción de expresión de la presente descripción también puede incluir secuencias diseñadas para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del péptido

expresado.

Se pueden utilizar diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente descripción en el sistema de la célula anfitriona. Tales métodos generalmente son descritos por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laborator y Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), por Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (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 at. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable, transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positiva-negativa.

Las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permiten la expresión de altas cantidades de polipéptido recombinante. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, entre otras, medios eficaces, biorreactores, temperatura, pH y condiciones 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 descripción. Tal medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células de la presente descripción se pueden cultivar en biorreactores de fermentación, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri convencionales. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro del conocimiento práctico de un experto en la técnica.

Dependiendo del vector y del sistema anfitrión utilizados para la producción, los péptidos y/o polipéptidos resultantes de la presente descripción pueden permanecer dentro de la célula recombinante, secretarse al medio de fermentación, secretarse a un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*; o mantenerse sobre la superficie externa de una membrana celular o viral.

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

La expresión "recuperar el polipéptido recombinante" utilizada en la presente memoria se refiere a recoger el medio de fermentación completo que contiene el polipéptido y no necesita implicar etapas adicionales de separación o purificación.

Por lo tanto, los péptidos y/o polipéptidos de la presente descripción pueden purificarse utilizando una variedad de técnicas convencionales de purificación de proteínas, tales como, pero no limitadas a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoque y solubilización diferencial.

Para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse mediante ingeniería genética para codificar el polipéptido de la presente descripción y el radical escindible fusionado. Tal proteína de fusión se puede diseñar de modo que el polipéptido se pueda aislar fácilmente mediante cromatografía de afinidad; p.ej., mediante inmovilización en una columna específica para el radical escindible. Cuando se diseña un sitio de escisión entre el polipéptido y el radical escindible, el polipéptido se puede liberar de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiados que escinden específicamente la proteína de fusión en este sitio [p.ej., ver Booth et al., Immunol. Lett. 19: 65 - 70 (1988); y Gardella et al., J. Biol. Chem. 265: 15854 - 1585 (1990)].

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

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en la presente memoria.

Además de ser sintetizables en células anfitrionas, el péptido y/o polipéptido de la presente descripción también se pueden sintetizar utilizando sistemas de expresión *in vitro*. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

Como se mencionó anteriormente, los polinucleótidos de la presente descripción también se pueden administrar directamente a un sujeto en el que se traducen en las células diana, es decir, terapia génica.

La terapia génica según se utiliza en la presente memoria se refiere a la transferencia de material genético (p.ej., ADN o ARN) de interés a un anfitrión para tratar o prevenir una enfermedad o afección o fenotipo genéticos o adquiridos. El material genético de interés codifica un producto (p.ej., una proteína, polipéptido, péptido, ARN funcional, antisentido) cuya producción *in vivo* es deseada. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima, polipéptido o péptido de valor terapéutico. Para una revisión, véase, en general, el texto "Gen Therapy" (Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997).

Se han desarrollado dos enfoques básicos para la terapia génica: terapia génica (1) ex vivo y (2) *in vivo*. En la terapia génica ex vivo, las células se retiran de un paciente y, mientras se cultivan, se tratan *in vitro.* Generalmente, se introduce un gen de reemplazo funcional en la célula a través de un vehículo/método de suministro de genes apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y a continuación las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al anfitrión/paciente. Se ha demostrado que estas células reimplantadas genéticamente expresan el material genético transfectado in situ. Las células pueden ser autólogas o no autólogas para el sujeto. Dado que es probable que las células no autólogas induzcan una reacción inmunitaria cuando se administran al cuerpo, se han desarrollado varios enfoques para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estos incluyen suprimir el sistema inmunitario del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas inmunoaislantes y semipermeables antes del trasplante.

En la terapia génica *in vivo*, las células diana no se retiran del sujeto, sino que el material genético a transferir se introduce en las células del organismo receptor in situ, es decir, dentro del receptor. En un aspecto alternativo, si el gen del anfitrión es defectuoso, el gen se repara in situ (Culver, 1998. (Resumen) Antisense DNA & RNA based therapeutics, febrero de 1998, Coronado, CA).

Se ha demostrado que estas células genéticamente alteradas expresan el material genético transfectado in situ.

Para conferir especificidad, preferiblemente las construcciones de ácido nucleico utilizadas para expresar los péptidos y/o polipéptidos de la presente descripción comprenden elementos de la secuencia del promotor específico de la célula, tales como promotores específicos del cáncer (p.ej., promotor de survivina - Chen et al., Cancer Gene Therapy, 2004, Volumen 11, Número 11, páginas 740-747).

Para la terapia génica, los ácidos nucleicos típicamente se introducen en las células por infección con agentes virales. Esto se debe a que se puede obtener una mayor eficacia debido a su naturaleza infecciosa. Además, los virus son muy especializados y típicamente infectan y se propagan en tipos de células específicos. Por lo tanto, su especificidad natural se puede utilizar para dirigir los vectores a tipos de células específicos *in vivo* o dentro de un tejido o cultivo mixto de células. Los vectores virales también pueden modificarse con receptores o ligandos específicos para alterar la especificidad de la diana a través de eventos mediados por el receptor.

Además, los vectores virales recombinantes son útiles para expresión *in vivo* de un ácido nucleico deseado puesto que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de direccionamiento. La infección lateral es inherente al ciclo de vida de, por ejemplo, los retrovirus y es el proceso mediante el cual una sola célula infectada produce muchos viriones de progenie que brotan e infectan las células vecinas. El resultado es que una gran área se infecta rápidamente, la mayoría de la cual no fue infectada inicialmente por las partículas virales originales. Esto está en contraste con el tipo vertical de infección en la que el agente infeccioso se propaga solo a través de la progenie hija. También se pueden producir vectores virales que no pueden propagarse lateralmente. Esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen específico en solo un número localizado de células diana.

Los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción se pueden utilizar para modular la translocación nuclear de polipéptidos endógenos y exógenos en células anfitrionas, incluyendo células en división (p.ej., líneas celulares) y que no están en división (p.ej., células primarias) y células eucarióticas tales como células de mamífero y células de levadura.

Por ejemplo, los autores de la presente invención han demostrado que los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción se comportan de forma autónoma y compiten con señales endógenas, tales como las comprendidas en quinasas N-terminales c-Jun 1/2 (JNK1/2) y proteína quinasa activadas por mitógenos p38 α/β (P38 α/β). Esto da como resultado una regulación anormalmente baja de la translocación nuclear de tales señales endógenas.

Dado que los péptidos de la presente descripción son capaces de inhibir específicamente las actividades nucleares de JNK1/2 y P38 α/β sin modular sus actividades citoplásmicas, estos péptidos se pueden utilizar para inhibir las actividades nucleares de JNK1/2 y P38 α/β (p.ej., actividad apoptótica, actividades inflamatorias) sin dañar otras actividades citoplásmicas relacionadas con JNK1/2 y P38 α/β en las células. Por lo tanto, los péptidos de este aspecto de la presente descripción pueden servir como agente terapéutico para enfermedades inflamatorias y relacionadas con apoptosis sin tener los efectos secundarios de otros inhibidores de JNK1/2 y P38 α/β.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para tratar un trastorno inflamatorio o inmunitario en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aislado descrito en la presente memoria en el sujeto, tratando así la enfermedad inflamatoria o inmunitaria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un sujeto mamífero, preferiblemente un ser humano.

Una serie de enfermedades y afecciones, que implican una respuesta inflamatoria se pueden tratar utilizando la metodología descrita anteriormente. Los ejemplos de tales enfermedades y afecciones se resumen a continuación.

Enfermedades inflamatorias Incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades inflamatorias agudas.

Enfermedades inflamatorias asociadas con hipersensibilidad

Los ejemplos de hipersensibilidad incluyen, pero no se limitan a, hipersensibilidad de Tipo I, hipersensibilidad de Tipo II, hipersensibilidad de Tipo III, hipersensibilidad de Tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos, hipersensibilidad mediada por linfocitos T y DTH.

Hipersensibilidad de Tipo I o inmediata, tal como asma.

La hipersensibilidad de tipo II incluye, pero no se limita a, enfermedades reumatoides, enfermedades autoinmunitarias reumatoides, artritis reumatoide (Krenn V. et al., Histol Histopathol jul 2000; 15 (3):791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Erikson J. et al., Immunol Res 1998; 17 (1-2):49), esclerosis, esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. mar 1999; 6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev jun 1999; 169:107), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunitarias glandulares, enfermedades autoinmunitarias pancreáticas, diabetes, diabetes Tipo I (Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract oct 1996; 34 Supl: S125), enfermedades tiroideas, enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am jun 2000; 29 (2):339), tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, J Immunol 15 de diciembre de 2000; 165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., Nippon Rinsho agosto 1999; 57 (8):1810), mixedema, mixedema idiopático (Mitsuma T. Nippon Rinsho. agosto 1999; 57 (8):1759); enfermedades autoinmunitarias reproductivas, enfermedades ováricas, autoinmunidad ovárica (Garza KM. et al., J Reprod Immunol feb 1998; 37 (2):87), infertilidad autoinmunitaria anti-esperma (Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. mar 2000; 43 (3):134), pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl 2: S107-9), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunitarias, esclerosis múltiple (Cruz AH. et al., J Neuroimmunol 1 de enero de 2001; 112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., J Neural Transm Supl. 1997; 49:77), miastenia gravis (Infante AJ. Y Kraig E, Int Rev Immunol 1999; 18 (1-2):83), neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. mayo 2000; 7 (3):191), síndrome de Guillain-Barre, neuropatías y neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki S. Am J Med Sci. abr 2000; 319 (4):234), enfermedades miasténicas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. abr 2000; 319 (4):204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofias cerebelosas, atrofias cerebelosas progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol (París) enero 2000; 156 (1):23); neuropatías, neuropatías disinmunitarias (Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Supl 1999; 50:419); neuromiotonía, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 13 de mayo de 1998; 841:482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, aterosclerosis (Matsuura E. et al., Lupus. 1998; 7 Supl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. Lupus. 1998; 7 Supl 2: S132), trombosis (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl 2: S107-9), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 25 de agosto de 2000; 112 (15-16):660); enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost.2000; 26 (2):157); vasculitis, vasculitis necrosante de pequeños vasos, poliangiítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis focal necrosante pauci-inmunitaria, glomerulonefritis en semilunas (Noel LH. Ann Med Interne (París). mayo de 2000; 151 (3):178); síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999; 14 (4):171); insuficiencia cardíaca, anticuerpos beta-adrenoceptores de tipo agonista en la insuficiencia cardíaca (Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 17 de junio de 1999; 83 (12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. Ann Ital Med Int. abril-junio de 1999; 14 (2):114); anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma enero de 1998; 28 (3-4):285), enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunitarias del tracto gastrointestinal, enfermedades intestinales, enfermedad intestinal inflamatoria crónica (Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. enero de 2000; 23 (1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. Harefuah 16 de enero de 2000; 138 (2):122), enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, miositis, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren (Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol sep 2000; 123 (1):92); enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother jun 1999; 53 (5-6):234), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunitarias hepáticas, hepatitis autoinmunitaria (Manns MP. J Hepatol agosto de 2000; 33 (2):326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. jun 1999; 11 (6):595).

La hipersensibilidad de tipo IV mediada por células T incluye, entre otras, enfermedades reumáticas, artritis reumatoide (Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci USA 18 de enero de 1994; 91 (2):437), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Datta SK., Lupus 1998; 7 (9):591), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunitarias glandulares, enfermedades pancreáticas, enfermedades autoinmunitarias pancreáticas, diabetes tipo 1 (Castano L. y Eisenbarth GS. Ana. Rev. Immunol. 8:647); enfermedades tiroideas, enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol mar 1993; 92 (1):77); enfermedades ováricas (Garza KM. et al., J Reprod Immunol feb 1998; 37 (2):87), prostatitis, prostatitis autoinmunitaria (Alexander RB. et al., Urology dic 1997; 50 (6):893), síndrome

poliglandular, síndrome poliglandular autoinmunitario, síndrome poliglandular autoinmunitario tipo I (Hara T. et al., Blood. 1 de marzo de 1991; 77 (5):1127), enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunitarias, esclerosis múltiple, neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, mayo de 1994; 57 (5):544), miastenia gravis (Oshima M. et al., Eur J Immunol, dic 1990; 20 (12):2563), síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 27 de marzo de 2001; 98 (7):3988), enfermedades cardiovasculares, autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 15 de octubre de 1996; 98 (8):1709), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (Semple JW. et al., Blood, 15 de mayo de 1996; 87 (10):4245), autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares (Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998; 11 (1):9), anemia hemolítica (Sallah S. et al., Ann Hematol mar 1997; 74 (3):139), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunitarias hepáticas, hepatitis, hepatitis activa crónica (Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol mar 1990; 54 (3):382), cirrosis biliar, cirrosis biliar primaria (Jones DE. Clin Sci (Colch) nov 1996; 91 (5):551), enfermedades nefríticas, enfermedades autoinmunitarias nefríticas, nefritis, nefritis intersticial (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol agosto de 1990; 1 (2):140), enfermedades del tejido conectivo, enfermedades del oído, enfermedades del tejido conectivo autoinmunitarias, enfermedad del oído autoinmunitaria (Yoo TJ. et al., Cell Immunol agosto de 1994; 157 (1):249), enfermedad del oído interno (Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci, 29 de diciembre1997; 830:266), enfermedades de la piel, enfermedades cutáneas, enfermedades dérmicas, enfermedades ampollosas de la piel, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso y pénfigo foliáceo.

Los ejemplos de hipersensibilidad de tipo retardado incluyen, pero no se limitan a, dermatitis de contacto y erupción por fármacos.

Los ejemplos de tipos de hipersensibilidad mediada por linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T auxiliares y linfocitos T citotóxicos.

Los ejemplos de hipersensibilidad mediada por linfocitos T auxiliares incluyen, pero no se limitan a, hipersensibilidad mediada por linfocitos T_h1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos T_h2.

Enfermedades autoinmunitarias

Incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a aterosclerosis (Matsuura E. et al., Lupus. 1998; 7 Supl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. Lupus. 1998; 7 Supl 2: S132), trombosis (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl 2: S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 25 de agosto de 2000; 112 (15-16):660), enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost. 2000; 26 (2):157), vasculitis necrosante de pequeños vasos, poliangitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis pauciinmunitaria focal necrosante y con formación de semilunas (Noel LH. Ann Med Interne (París). mayo de 2000; 151 (3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999; 14 (4):171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 17 de junio de 1999; 83 (12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. Ann Ital Med Int. abril-junio de 1999; 14 (2):114; Semple JW. et al., Blood, 15 de mayo de 1996; 87 (10):4245), anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma enero de 1998; 28 (3-4):285; Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar; 74 (3):139), autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 15 de octubre de 1996; 98 (8):1709) y autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares (Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998; 11 (1):9).

Los ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (Krenn V. et al., Histol Histopathol jul 2000;15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A enero de 1994 18; 91 (2):437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189).

Los ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pancreática, diabetes tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmunitaria antiesperma, prostatitis autoinmunitaria y síndrome poliglandular autoinmunitario tipo I. Las enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitarias del páncreas, diabetes tipo 1 (Castano L. y Eisenbarth GS. Ana. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract oct 1996; 34 Supl: S125), enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am jun 2000; 29 (2):339; Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol mar 1993; 92 (1):77), tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, J Immunol 15 de diciembre de 2000; 165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug; 57 (8):1810), mixedema idiopático (Mitsuma T. Nippon Rinsho. agosto de 1999; 57 (8):1759), autoinmunidad ovárica (Garza KM. et al., J Reprod Immunol feb 1998; 37 (2):87), infertilidad autoinmunitaria anti-esperma (Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. mar 2000; 43 (3):134), prostatitis autoinmunitaria (Alexander RB. et al., Urology dic 1997; 50 (6):893) y síndrome poliglandular autoinmunitario tipo I (Hara T. et al., Blood. 1 de marzo de 1991; 77 (5):1127).

Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. enero de 2000; 23 (1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. Harefuah 16 de enero de 2000; 138 (2):122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

De acuerdo con un aspecto concreto de la presente descripción, la enfermedad es colitis.

Los ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, enfermedades ampollosas autoinmunitarias de la piel, tales como, entre otras, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso y pénfigo foliáceo.

Los ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmunitaria (Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol mar 1990; 54 (3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. Clin Sci (Colch) nov 1996; 91 (5):551; Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. jun 1999; 11 (6):595) y hepatitis autoinmunitaria (Manns MP. J Hepatol ago 2000; 33 (2):326).

Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple (Cruz AH. et al., J Neuroimmunol 1 de enero de 2001; 112 (1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., J Neural Transm Supl. 1997; 49:77), miastenia gravis (Infante AJ. Y Kraig E, Int Rev Immunol 1999; 18 (1-2):83; Oshima M. et al., Eur J Immunol, dic 1990; 20 (12):2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. mayo 2000; 7 (3):191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki S. Am J Med Sci. abr 2000; 319 (4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. abr 2000; 319 (4):204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci units S A 27 de marzo de 2001; 98 (7):3988); síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofias cerebelosas progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol (París) enero 2000; 156 (1):23); neuropatías disinmunitarias (Nobile-Orazio E. et al., Electroencefalograma Clin Neurophysiol Supl 1999; 50:419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 13 de mayo de 1998; 841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, mayo 1994; 57 (5):544) y enfermedades neurodegenerativas.

Los ejemplos de enfermedades musculares autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, miositis, miositis autoinmunitaria y síndrome de Sjogren primario (Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol sep 2000; 123 (1):92) y enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother jun 1999; 53 (5-6):234).

Los ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, nefritis y nefritis intersticial autoinmunitaria (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol agosto 1990; 1 (2):140).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la reproducción incluyen, pero no se limitan a, pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl 2: S107-9).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias del tejido conjuntivo incluyen, entre otras, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunitarias del oído (Yoo TJ. et al., Cell Immunol agosto 1994; 157 (1):249) y enfermedades autoinmunitarias del oído interno (Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci, 1997, 29 de diciembre; 830:266).

Los ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico (Erikson J. et al., Immunol Res 1998; 17 (1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. mar 1999; 6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev jun 1999; 169:107).

Enfermedades infecciosas

Los ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades virales, enfermedades bacterianas, enfermedades protozoarias, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasmas y enfermedades por priones.

Enfermedades de rechazo de injerto

Los ejemplos de enfermedades asociadas con el trasplante de un injerto incluyen, entre otros, rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto hiperagudo, rechazo de injerto agudo y enfermedad de injerto contra anfitrión.

Enfermedades alérgicas

Los ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, entre otros, asma, urticaria, alergia al polen, alergia a ácaros del polvo, alergia a venenos, alergia a cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a los medicamentos, alergia a las picaduras de insectos, alergia a la caspa animal, alergia a plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia a los alimentos.

Enfermedades cancerosas

Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos concretos de enfermedades cancerosas incluyen pero no se limitan a: leucemia mieloide tal como la leucemia mielógena crónica. Leucemia mielógena aguda con maduración. Leucemia promielocítica aguda, Leucemia no linfocítica aguda con aumento de basófilos, Leucemia monocítica aguda. Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia; Linfoma maligno, tal como el de Burkitt No Hodgkin; Leucemia linfocítica, tal como Leucemia linfoblástica aguda. Leucemia linfocítica crónica; Enfermedades mieloproliferativas, tales como Meningioma Benigno de tumores sólidos, Tumores mixtos de la glándula salival, Adenomas colónicos; Adenocarcinomas, tales como Cáncer de pulmón de células pequeñas, Riñón, Útero, Próstata, Vejiga, Ovario, Colon, Sarcomas, Liposarcoma mixoide, Sarcoma sinovial, Rabdomiosarcoma (alveolar), Condrosarcoma mixoide extraesquelético, Tumor de Ewing; otros incluyen Disgerminoma testicular y ovárico, Retinoblastoma, Tumor de Wilms, Neuroblastoma, Melanoma maligno, Mesotelioma, mama, piel, próstata y ovario.

La presente descripción también anticipa la prevención de la translocación nuclear de polipéptidos que comprenden endógenamente los péptidos señal identificados actualmente mediante la mutación de las secuencias identificadas de la presente descripción mediante el uso de estrategias de activación y similares.

Otro medio para modular la translocación nuclear de polipéptidos endógenos es por interacción proteína/proteína. Por lo tanto, por ejemplo, un péptido de direccionamiento nuclear 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 une indirectamente al péptido de direccionamiento nuclear.

Se apreciará que, además de funcionar para modular la translocación de polipéptidos endógenos, los péptidos de la presente descripción se pueden unir a una sustancia heteróloga a través de un conector, actuando así como portadores, transportando la sustancia heteróloga al núcleo de una célula. Se apreciará que el péptido de direccionamiento nuclear de la presente descripción también puede unirse a una sustancia heteróloga en la célula y no in vitro. De este modo, la sustancia heteróloga se puede administrar a la célula antes, en concomitancia con o después de la administración del péptido de direccionamiento nuclear.

La sustancia heteróloga puede ser cualquier material cuyo direccionamiento al núcleo se desee, p.ej. un agente farmacéutico tal como un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un agente cosmético. Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga puede ser un polipéptido, un polinucleótido, un lípido, un carbohidrato, una hormona, un esteroide, un pequeño producto químico, un virus y cualquier combinación de los mismos y similares.

De acuerdo con un aspecto de este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga es un polipéptido. El polipéptido puede ser, por ejemplo, una proteína de inmortalización (p.ej., antígeno T grande de SV40 y telomerasa), una proteína antiapoptótica (p.ej., p53 mutante y Bclx.sub.xL), un anticuerpo, un oncogén (p.ej., Ras, myc, E6/E7 de HPV y E1a de Adenovirus), una proteína reguladora del ciclo celular (p.ej., ciclina y quinasa dependiente de ciclina), o una enzima (p.ej., proteína fluorescente verde, beta-galactosidasa y cloranfenicol acetil transferasa).

De acuerdo con otro aspecto de este aspecto de la presente descripción, 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 codificante o no codificante (p.ej., un oligonucleótido antisentido).

La capacidad de transferir de manera segura y eficaz ácidos nucleicos a las células es un objetivo fundamental en biotecnología. Los sistemas actuales de suministro sintético, aunque son seguros, son relativamente ineficaces. Uno de los principales obstáculos para el suministro eficaz de genes es el direccionamiento del material genético hacia el núcleo. En los métodos actuales de suministro de genes, el movimiento del ADN a través del citosol hacia el núcleo ocurre por difusión, un procedimiento relativamente lento durante el cual el material genético se expone a un entorno citoplásmico degradante. Ya se ha logrado mejorar la eficacia de la translocación nuclear de ácidos nucleicos mediante la incorporación de péptidos de direccionamiento nuclear; véanse, por ejemplo, Zanta et al., PNAS, Vol. 96, Número 1, 91-96, 5 de enero, 1999; Subramanian, A. et al., (1999) Nat. Biotechnol. 17: 873-877.

Por lo tanto, los autores de la presente invención prevén que los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción aumentarán la eficacia de diversos protocolos de transfección, incluyendo, entre otros, microinyección, electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, introducción mediada por DEAE-dextrano, introducción mediada por liposomas, introducción mediada por virus, inyección de ADN desnudo. y bombardeo biolístico.

De acuerdo con otro aspecto más de este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga es un virus. El virus puede ser un virus completo o un núcleo vírico que contiene ácido nucleico viral (es decir, ácido nucleico viral empaquetado en ausencia de una envoltura viral). Los ejemplos de virus y núcleos de virus que se pueden transportar incluyen, pero no se limitan a, virus del papiloma, adenovirus, baculovirus, núcleo de retrovirus y núcleo de virus Semliki.

De acuerdo con otro aspecto más de este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga es una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, un radionúclido, un marcador fluorescente o un

colorante.

De acuerdo con un aspecto adicional de este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga es un sistema de suministro de fármacos tal como, p.ej. partículas magnéticas, esferas de sílice, PLGA, nano o microesferas, quitosano, etc.

De acuerdo con otro aspecto más de este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga es un radical de afinidad, tal como un anticuerpo, un ligando de receptor o un carbohidrato. La unión de radicales de afinidad a los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción es particularmente beneficiosa cuando es deseable dirigir un tipo de célula concreto con el péptido de direccionamiento nuclear. Los ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar de acuerdo con este aspecto de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos tumorales, anticuerpos anti-CD20 y anticuerpos anti-IL 2R alfa. Los receptores ilustrativos incluyen, entre otros, receptores de folato y receptores de EGF. Un carbohidrato ilustrativo que se puede utilizar de acuerdo con este aspecto de la presente descripción es la lectina.

De acuerdo con otro aspecto más de este aspecto de la presente descripción, la sustancia heteróloga es un radical detectable.

El radical detectable puede detectarse directamente de forma típica en virtud de su emisión de radiación de una longitud de onda concreta (p.ej., un agente fluorescente, un agente fosforescente o un agente quimioluminiscente). Alternativamente, el radical detectable puede ser no detectable directamente. Por ejemplo, el radical de agente detectable puede ser un sustrato para una reacción enzimática que es capaz de generar un producto detectable.

Se apreciará que los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción se pueden unir a más de una sustancia heteróloga directa o indirectamente.

La sustancia heteróloga se puede unir al péptido de direccionamiento nuclear de la presente descripción mediante cualquier método conocido en la técnica y que sea apropiado para esa sustancia heteróloga concreta. Así, por ejemplo, si la sustancia heteróloga es un polipéptido, el conector puede comprender un enlace peptídico o un enlace peptídico sustituido, como se describió anteriormente. Si la sustancia heteróloga es una molécula pequeña, el conector puede comprender un enlace no peptídico.

Los ejemplos de métodos de enlace incluyen, pero no se limitan a, entrecruzamiento químico, fusión genética y formación de puentes.

Entrecruzamiento químico: Se puede utilizar un agente de entrecruzamiento homobifuncional o un agente de entrecruzamiento heterobifuncional para entrecruzar un péptido de direccionamiento nuclear de la presente descripción con una sustancia heteróloga. El agente de entrecruzamiento homobifuncional o heterobifuncional puede escindirse para facilitar la separación del péptido de direccionamiento nuclear de la sustancia heteróloga después de que el péptido de direccionamiento nuclear transporte la sustancia heteróloga a través de una membrana celular. Los agentes de entrecruzamiento homobifuncionales tienen al menos dos grupos reactivos idénticos. El uso de agentes de entrecruzamiento homobifuncionales puede dar como resultado la autoconjugación, el entrecruzamiento intramolecular y/o la polimerización. Los agentes de entrecruzamientos homobifuncionales son principalmente reactivos con aminas primarias (p.ej., imidoésteres, ésteres de N-succinimidilo, isotiocianatos, ácidos carboxílicos y cloruros de sulfonilo) o reactivos con sulfhidrilo (p.ej., 2-piridilditio, 3-nitro-2-piridilditio, maleimida, vinilsulfona, haluro de arilo, dinitrofluorobenceno, organomercurial, p-cloromercuribenzoato, bismaleimidohexano, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno y 1,4-di-(3'-(2'-pirioilditio)-propionamido)butano). Los ejemplos de imidoésteres homobifuncionales incluyen, pero sin limitación, dimetiladipimidato, dimetilsuberimidato y ditiobispropionimidato. Los ejemplos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen, pero no se limitan a, glutarato de disuccinimidilo, suberato de disuccinimidilo, suberato de bis(sulfosuccinimidilo), ditiobis(propionato de succinimidilo) y tartrato de disuccinimidilo.

Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales poseen dos o más grupos reactivos diferentes que permiten la conjugación secuencial con grupos específicos, minimizando así la polimerización o la autoconjugación no deseables. Algunos agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales son reactivos con aminas en un extremo y reactivos con sulfhidrilo en el otro extremo. Los ejemplos de tales agentes de entrecruzamiento incluyen, pero no se limitan a, 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 entrecruzamiento homobifuncionales o heterobifuncionales pueden detenerse después de añadir la unión del agente de entrecruzamiento homobifuncional o heterobifuncional al péptido de direccionamiento nuclear. El péptido de direccionamiento nuclear con un agente de entrecruzamiento homobifuncional o heterobifuncional se puede purificar por medio de métodos bien conocidos en la técnica y utilizar como una reserva para añadir sustancias heterólogas. Tales péptidos de direccionamiento nuclear purificados con el reactivo de entrecruzamiento homobifuncional o heterobifuncional unido se pueden almacenar, por ejemplo, a -20°C. en alícuotas y posteriormente descongelar. Una vez descongelados, se puede agregar una sustancia heteróloga completando la reacción de entrecruzamiento.

Fusión genética: Las fusiones genéticas se pueden generar uniendo una secuencia codificante para un péptido de direccionamiento nuclear en marco con una secuencia codificante de una sustancia heteróloga polipeptídica. Existen muchos métodos en la técnica para unir secuencias codificantes entre sí. Los métodos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR "stitch", y digestión y ligación por endonucleasas de restricción. Preferiblemente, los marcos de lectura del péptido de direccionamiento nuclear y la sustancia heteróloga están en marco y fusionados transcripcionalmente.

Se puede incluir un sitio de escisión de proteasa entre el péptido de direccionamiento nuclear y la sustancia heteróloga polipeptídica. Los ejemplos de tales sitios de escisión de proteasas incluyen, pero no se limitan a, proteasa del Factor Xa y del virus del grabado del tabaco (TEV).

Moléculas de formación de puente: Los péptidos de direccionamiento nuclear y las sustancias heterólogas pueden formar complejos utilizando pares de moléculas de formación de puente. Los ejemplos de tales pares incluyen, pero no están limitados a, (a) estreptavidina y biotina, (b) glutatión y glutatión-S-transferasa, y (c) polihistidina y un reactivo de cromatografía de afinidad (p.ej., ácido nitrilotriacético tetradentado (NTA) o ácido iminodiacético (IDA)), que interactúan a través de un ion como Ni^{+2}. Un péptido de direccionamiento nuclear se puede conectar a cualquiera de los miembros del par, y una sustancia heteróloga se conecta a la otra molécula de formación de puente. Por ejemplo, si el péptido de direccionamiento nuclear se conecta a la glutatión-S-transferasa, la carga se conecta al glutatión. Alternativamente, el péptido de direccionamiento nuclear se puede conectar a estreptavidina y la sustancia heteróloga se puede conectar a biotina. El péptido de direccionamiento nuclear y la estreptavidina se pueden conectar por cualquier método conocido en la técnica para conectar un péptido y una molécula de formación de puente. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, entrecruzamiento químico o fusión genética. La sustancia heteróloga se conecta a continuación a biotina mediante cualquier método conocido en la técnica para biotinilar moléculas pequeñas, proteínas o ácidos nucleicos, tales como entrecruzamiento químico. El complejo de péptido de direccionamiento nuclear/sustancia heteróloga se puede formar poniendo en contacto el péptido de direccionamiento nuclear - estreptavidina con la sustancia heteróloga biotinilada.

Un péptido de direccionamiento nuclear y una sustancia heteróloga pueden complejarse químicamente o utilizando pares de moléculas de formación de puente en cualquier posición ya sea en el péptido de direccionamiento nuclear o en la sustancia heteróloga, haciendo que la funcionalidad del péptido de direccionamiento nuclear o la sustancia heteróloga no se destruya. Por ejemplo, un agente de entrecruzamiento reaccionará con grupos funcionales apropiados localizados en el extremo amino o extremo carboxi (para proteínas), en el extremo 5' o en el extremo 3' (para ácidos nucleicos), o en toda la molécula.

Un experto en la técnica podrá determinar si las partes respectivas del complejo de péptido de direccionamiento nuclear/sustancia heteróloga conservan la actividad biológica. El péptido de direccionamiento nuclear conserva la actividad biológica si puede translocar la sustancia heteróloga conectada a un núcleo celular. Se puede determinar la actividad de transporte, por ejemplo, añadiendo el complejo de péptido de direccionamiento nuclear/sustancia heteróloga a las células y sometiendo a ensayo las células para determinar si la sustancia heteróloga se suministró al núcleo utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como tinción inmunohistoquímica. La sustancia heteróloga puede someterse a ensayo para determinar la actividad utilizando un método aceptable para el tipo de sustancia heteróloga (p.ej., un ensayo enzimático para una enzima, un ensayo de transformación para una oncoproteína, un ensayo antiapoptótico para una proteína antiapoptosis y un ensayo de inmortalización para una proteína de inmortalización). Estos ensayos son bien conocidos en la técnica y son descritos por Sambrook et al., 1989 y Ausubel et al., 1989.

Si el péptido de direccionamiento nuclear y la sustancia heteróloga polipeptídica están conectadas genéticamente, el radical de carga polipeptídico puede complejarse con el extremo amino del péptido de direccionamiento nuclear o con el extremo carboxi del péptido de direccionamiento nuclear. Preferiblemente, el radical de carga polipeptídico está complejado con el extremo N del péptido de direccionamiento nuclear.

Los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción se pueden administrar a las células per se o como parte de una composición farmacéutica en donde se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

Según se utiliza en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria, el término "ingrediente activo" se refiere a los péptidos de direccionamiento nuclear de la presente descripción, ya sea solos o conectados a un agente heterólogo, o polinucleótidos que los codifican, que son responsables del efecto biológico.

En lo sucesivo, las expresiones "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que se pueden utilizar indistintamente se refieren a un portador o un diluyente que no causan irritación significativa a un organismo y no anulan la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un coadyuvante está incluido en estas expresiones. Uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente aceptable puede

ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter et al. (1979).

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. Los 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 formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences, "Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Alternativamente, se puede administrar la preparación de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la 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 aprovechar su especificidad por la diana y, en consecuencia, no tiene que administrarse localmente en el sitio enfermo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden fabricar por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente descripción se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

Para su inyección, los ingredientes activos de la descripción pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se vaya a penetrar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la descripción se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones de partículas sólidas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando 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 de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas cuentan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificar o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las composiciones farmacéuticas, que se pueden utilizar por vía oral, incluyen cápsulas duras elaboradas de gelatina así como cápsulas blandas selladas elaboradas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

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

Para administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con la presente descripción

se suministran convenientemente en forma de una presentación en aerosol a partir de un paquete presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para utilizar en un dispensador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

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

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 inyectables apropiadas a base de aceite o agua. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores 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, p.ej., una solución estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

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

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente descripción incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

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

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la descripción, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos in vitro. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios con animales se pueden utilizar 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 a la vista del estado del paciente. [Véase, p.ej., Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 pág.1].

Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección que se vaya a tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se produce la curación o se logra la disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición que se vaya a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, la gravedad de la aflicción, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc.

Se apreciará que los polipéptidos y polinucleótidos de la presente descripción pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para lograr un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente en sí mismo. En tal terapia, se toman medidas (p.ej., dosificación y selección del agente complementario) para los efectos secundarios adversos que pueden estar asociados con las terapias combinadas.

Las composiciones que incluyen la preparación de la presente descripción formuladas en un portador farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Las composiciones de la presente descripción pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que pueden contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico,

tal como un paquete blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El paquete o dispensador también puede albergar una nota asociada con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya nota refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración veterinaria. Tal nota, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. para medicamentos con receta o de un producto aprobado.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a ± 10%.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluyen pero no se limitan a".

El término "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

El término "consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la sustancia composición, método o estructura reivindicados.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada que incluyen, pero no se limitan a aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por parte de profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Se aprecia que ciertas características de la descripción, que, por claridad, se describen en el contexto de aspectos separados, también se pueden proporcionar combinadas en un único aspecto. Por el contrario, varias características de la descripción, que, por brevedad, se describen en el contexto de un único aspecto, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otro aspecto descrito de la descripción. Ciertas características descritas en el contexto de varios aspectos no deben considerarse características esenciales de esos aspectos, a menos que el aspecto sea inoperante sin esos elementos.

Diversos aspectos y aspectos de la presente descripción tal como se delinearon anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunos aspectos de la descripción de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente descripción incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente 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., ed. (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 DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (ed) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); las metodologías expuestas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 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., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (ed), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (ed), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 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., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., ed. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., ed. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (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 a lo largo de la presente memoria. Se cree que los procedimientos de la misma son bien conocidos en la técnica y se

proporcionan para la comodidad del lector.

Materiales y métodos

Construcciones de ADN y mutaciones: se clonaron GFP-JNK1/2, p38α/β en pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA). Las secuencias de JNK1/2 y p38α/β se amplificaron a partir de ADNc de células HeLa y se flanquearon con EcoRI/BamHI para JNK2 y p38β, y con XhoI/BamHI para JNK1 y p38α. Las mutaciones puntuales de JNK1/2 y p38α/β se realizaron mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se clonaron GST-JNK1/2, p38α/β en el vector pGEX-2T (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y se flanquearon con sitios de restricción SpeI/NotI. La mutación de deleción de los extremos N- y C-terminal de GFP-p38α se realizó utilizando cebadores específicos para construir la deleción N-terminal Δ7/Δ20/Δ30 o la mutación por deleción C-terminal Δ40. Las Importinas 3, 7 y 9 se clonaron en pEGFP-C. Las Importinas 7 y 9 se amplificaron a partir de ADNc de células HeLa utilizando cebadores específicos flanqueados por los sitios de restricción BamHI/SalI para la Importina 7 y XhoI/SalI para la Importina 9. La Importina 3 se adquirió a partir de la colección de plásmidos del depósito Forchheimer, y se amplificó utilizando cebadores específicos flanqueados por sitios de restricción XhoI/EcoRI.

Cultivo celular y transfección: Las células HeLa y MCF7 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un suplemento de L-glutamina 2 mM, Pen/Estrep al 1% y suero bovino fetal al 10% (FBS). Las células HB2 se cultivaron en el mismo medio con la adición de hidrocortisona (0,5 mg/ml) e insulina (10 µg/ml). Las células MCF10A se cultivaron en DMEM/F-12 con suero de caballo al 5%, EGF (200 ng/ml), hidrocortisona (0,5 mg/ml), toxina del cólera (100 ng/ml), insulina (10 µg/ml), L-glutamina 2 mM, pen/estrep al 1% y FBS al 10%. Todas las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO_2. Las células HeLa se transfectaron utilizando polietilenimina (Sigma). Los ARNip se transfectaron utilizando Dharmafect (Thermo Fisher Scientific, CO, EE.UU.).

***Microscopía de inmunofluorescencia*:** Las células se fijaron en paraformaldehído al 3% en PBS (20 min, 23°C), y se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS (15 min, 23°C), seguido de permeabilización con Triton X-100 (0,1 % en PBS, 5 min, 23°C). Las células fijadas se incubaron a continuación con los Ab primarios (60 min, 23°C), se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con Ab secundario conjugado con rodamina (60 min, 23°C) y DAPI. Los portaobjetos se visualizaron mediante microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40). La corrección del fondo y el ajuste de contraste de las imágenes de datos brutos se realizaron utilizando Photoshop (Adobe, CA, EE.UU.).

Co-Inmunoprecipitación: Las células HeLa se cultivaron hasta la subconfluencia, se privaron de suero (SFB al 0,1% durante 16 h) y a continuación se estimularon o se trataron con otros fármacos. Los extractos celulares se produjeron como se describió previamente y se incubaron durante 2 horas (4°C, con rotación) con esferas de A/G-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) conectadas previamente a los Ab específicos (1 h, 23°C). Las esferas de A/G unidas se lavaron tres veces con tampón de lavado enfriado con hielo. Las esferas InmunoPrecipitadas se resuspendieron a continuación con tampón de muestra 1,5X y se hirvieron; las proteínas resueltas se analizaron mediante transferencia de Western con los Ab indicados.

Ensayo de ligación de proximidad (PLA): Las interacciones proteína-proteína se detectaron con el kit Duolink PLA (Olink Bioscience), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron, fijaron y permeabilizaron como se describe. A continuación, las muestras se incubaron con Ab primarios contra dos proteínas examinadas (60 min, 23°C), se lavaron, (Tris HCl 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%), y a continuación se incubaron con sondas específicas (60 min , 37°C), seguido de tinción con DAPI para visualizar los núcleos y lavar con Tampón B: Tris HCl 0,2 M pH 7,5, NaCl 0,1 M. La señal se visualizó como puntos fluorescentes distintos mediante microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40). La corrección del fondo, el ajuste del contraste de las imágenes de datos brutos y la cuantificación de la señal de fluorescencia se realizaron utilizando Photoshop (Adobe) e ImageJ.

Interacción in vitro: Las células HeLa se cultivaron hasta la subconfluencia, se privaron de suero (FBS al 0,1% durante 16 h) y a continuación se trataron con estímulos u otros fármacos. Los extractos celulares se produjeron como se describe y se incubaron durante 2 horas (4°C) con esferas de agarosa A/G (Santa Cruz Biotechnology) conectadas previamente a los Ab específicos (1 hora, 23°C). Las esferas de A/G unidas se lavaron secuencialmente una vez con tampón RIPA, a continuación dos veces con LiCl 0,5 M y dos veces con Tampón A. Las esferas de A/G unidas se resuspendieron después en Tampón A que contenía BSA al 0,01% y se dividieron en alícuotas. Las proteínas etiquetadas con GST se incubaron con las esferas durante 2 h (4°C), a continuación se lavaron y se resuspendieron en 1,5 X de tampón de muestra y se hirvieron.

Filtración en gel: Las células HeLa se privaron de suero (como anteriormente) y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml, 15 min) y TPA (250 nM, 15 min), o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares (25 mg de cada tratamiento) se cargaron en una columna de exclusión por tamaño 16/60 superdex 200 (velocidad de flujo 1 ml/min), y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones se analizaron utilizando transferencia Western con los Ab apropiados.

Análisis estadístico: Los datos se expresan como media ± E.T. La evaluación estadística se llevó a cabo utilizando

el análisis funcional y la prueba t de Student (dos colas) para evaluar las diferencias entre el control y los resultados experimentales. Valores de p <0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Ejemplo 1

JNK y p38 se traslocan al núcleo utilizando un mecanismo independiente de NTS

En la búsqueda de proteínas lanzadera independientes de NLS, los autores de la presente invención han investigado la localización subcelular de JNK1/2 y p38α/β. Utilizando inmunotinción con anticuerpos específicos (Ab) se encontró que, similar a ERK1/2, JNK1/2 y p38α/β se localizan principalmente en el citoplasma de las células en reposo (Figura 7A y Figuras 8A-B). Tratando las células con estrés o estimulantes mitogénicos (anisomicina y TPA, respectivamente), se observó una translocación nuclear rápida y robusta de las cuatro isoformas de MAPK, con solo pequeñas diferencias en su cinética de translocación. Curiosamente, esta translocación no se correlacionaba con la fosforilación activadora de JNK1/2 y p38 α/β (Figura 7B), lo que indica que el mecanismo de translocación de estas cuatro MAPK es diferente del de ERK1/2. Además, ninguna de las proteínas JNK o p38 contenía una NTS, y solo dos, JNK2 y p38β, contenían una secuencia fosforilable (T-P-S) en la misma región de quinasa. Sin embargo, la secuencia pronunciada y las similitudes de conformación entre JNK1/2 y p38α/β con ERK1/2, pueden sugerir que las primeras todavía utilizan una secuencia de tipo NTS dentro de su dominio de inserción de quinasa para su translocación. Para excluir esta posibilidad, los autores de la presente invención mutaron los residuos alineados con las NTS fosforiladas en JNK1 o p38α a residuos Ala o Glu en las cuatro MAPK. A diferencia de ERK1/2, la expresión anormalmente alta de estos mutantes dio como resultado una distribución similar a la de las proteínas WT (Figura 9), lo que indica que JNK1/2 y p38α/β difieren de ERK1/2 no solo en la liberación de la proteína de anclaje, sino también en su mecanismo de translocación.

Ejemplo 2

JNK1/2 y p38α/β interactúan con Imp3, 7 y 9 después de la estimulación

La falta de NTS similar a ERK1/2, así como una NLS canónica o atípica, y la incapacidad de JNK1/2 y p38α/β para interactuar con Impα o Impβ directa o indirectamente, provocó la búsqueda de su mecanismo real de translocación. Dado que las Imp de tipo β (Tabla 3 a continuación) han sido implicadas en la translocación estimulada de las proteínas de señalización, se formuló la hipótesis de que una o más de estas Imp están implicadas en el proceso. Para examinar esto, se utilizó un escrutinio de coinmunoprecipitación (CoIP) para detectar si alguna de ellas podría interactuar con JNK1/2 y p38α/β. A pesar de la expresión de estas Imp en las células examinadas, no se detectaron interacciones Imp/MAPK significativas en las células HeLa en reposo (Figura 1A). Sin embargo, la IP de JNK1/2 y p38α/β, en extractos de células HeLa estimuladas, reveló un grado variable de interacción de las cuatro MAPK con las Imp 3, 7 y 9. Es importante destacar que el escrutinio y otros experimentos de IP demostraron solo pequeñas diferencias en asociación o sincronización de las interacciones entre los componentes, sugiriendo un modo similar de regulación entre ellos.

Tabla 3

Lista de proteínas similares a Impβ

Ejemplos de proteínas de señalización como "cargas"	***Acrónimos***	***Importina***
Actuando con o sin Importina-α para inducir la translocación de varias proteínas de señalización[1]	Kapβ1, IMB1, IPOB, KPNB1	Importina-β
c-jun[2], NPM-ALK[3]YBP1[3], EWS[4]	TNPO1, IMB2, MIP1, Kapβ2	Importina 2
Sin moléculas de señalización conocidas	TNPO2, KPNB2B, Tm-SR	Importina 3
VitD Rec.[5], HIF1-α[6]	IMB4, RanBP4	Importina 4
c-jun[2], p60TRP[7]	IMB3, RANBP5, Kapβ3, KPNB3	Importina 5
ERKI/2[8,9], MEK1[8], SMAD3/4[8,10] Egr1[11], HIF1α[6], c-jun[2], Glucocorticoide Rec.[12]	RANBP7	Importina 7
SMAD1/3/4[10], NPM-ALK[3]	RANBP8	Importina 8

Ejemplos de proteínas de señalización como "cargas"	*Acrónimos*	*Importina*
PR65 de PP2A[13], c-jun[2]	IMB5	Importina 9
Sin moléculas de señalización conocidas	RanBP11, KA120	Importina 11
MLF2[14], RBM4[14]	**TNPO3**, TRN-SR (1-3), MTR10A	Importina 12
Glucocorticoide Rec.[15], c-jun[2]	KAP13, RANBP13, LGL2	Importina 13

Referencias para la Tabla 3.

1. Chook, Y.M. & Suel, K.E. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. Biochim Biophys Acta 1813, 1593-1606 (2011).

2. Waldmann, I., Walde, S. & Kehlenbach, R.H. Nuclear import of c-Jun is mediated by multiple transport receptors. J Biol Chem 282, 27685-27692 (2007).

3. Wu, F., Wang, P., Young, L.C., Lai, R. & Li, L. Proteome-wide identification of novel binding partners to the oncogenic fusion gene protein, NPM-ALK, using tandem affinity purification and mass spectrometry. Am J Pathol 174, 361-370 (2009).

4. Zakaryan, R.P. & Gehring, H. Identification and characterization of the nuclear localization/retention signal in the EWS proto-oncoprotein. J Mol Biol 363, 27-38 (2006).

5. Miyauchi, Y. et al. Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. J Biol Chem 280, 40901-40908 (2005).

6. Chachami, G., Paraskeva, E., Georgatsou, E., Bonanou, S. & Simos, G. Bacterially produced human HIF-1 alpha is competent for heterodimerization and specific DNA-binding. Biochem Biophys Res Commun 331, 464-470 (2005).

7. Heese, K. et al. Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. J Cell Biochem 91, 1030-1042 (2004).

8. Chuderland, D., Konson, A. & Seger, R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. Mol Cell 31, 850-861 (2008).

9. Lorenzen, J.A. et al. Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. Development 128, 1403-1414 (2001).

10. Yao, X., Chen, X., Cottonham, C. & Xu, L. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. J Biol Chem 283, 22867-22874 (2008).

11. Chen, J., Liu, M.Y., Parish, C.R., Chong, B.H. & Khachigian, L. Nuclear import of early growth response-1 involves importin-7 and the novel nuclear localization signal serine-proline-serine. Int J Biochem Cell Biol 43, 905-912 (2011).

12. Freedman, N.D. & Yamamoto, K.R. Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. Mol Biol Cell 15, 2276-2286 (2004).

13. Lubert, E.J. & Sarge, K.D. Interaction between protein phosphatase 2A and members of the importin beta superfamily. Biochem Biophys Res Commun 303, 908-913 (2003).

14. Lai, M.C., Kuo, H.W., Chang, W.C. & Tarn, W.Y. A novel splicing regulator shares a nuclear import pathway with SR proteins. Embo J 22, 1359-1369 (2003).

15. Tao, T., Lan, J., Lukacs, G.L., Hache, R.J. & Kaplan, F. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. American journal of respiratory cell and molecular biology 35, 668-680 (2006).

Para verificar estas interacciones, los experimentos de CoIP se repitieron en células MCF7, y las interacciones de las MAPK expresadas de manera anormalmente alta con las Imp se examinaron en células HeLa. Ambos experimentos confirmaron que la IP de Imp3/7/9 no son específicas solo para las proteínas HeLa endógenas

(Figuras 10A-B). Además, se realizó un ensayo de ligación de proximidad (PLA), que es una herramienta independiente de CoIP para estudios de interacción proteína-proteína. De forma similar a los resultados de CoIP, no se detectaron interacciones basales significativas entre las Imp y las MAPK examinadas (Figura 1B). Sin embargo, la estimulación con anisomicina o TPA produjo un marcado aumento en la interacción de JNK1/2 o p38α/β con las Imp 3/7/9. Como se esperaría del papel de lanzadera de las Imp, se encontraron interacciones principalmente en el citoplasma y las regiones perinucleares. Estos resultados indican que la interacción estimulada de las Imp 3/7/9 con las MAPK se produce primero en el citoplasma y las importinas se separan de las MAPK durante el desplazamiento o inmediatamente después de la translocación.

Ejemplo 3

Imp3, 7 y 9 son necesarias para la translocación de JNK1/2 o p38α/β al núcleo

Para respaldar adicionalmente el papel de Imp3/7/9 en la translocación nuclear de JNK1/2 o p38α/β, se realizaron experimentos de desactivación utilizando su ARNip. Una reducción de la expresión de Imp5 y un ARNip no relevante sirvieron como controles. Los ARNip de las cuatro Imp examinadas redujeron la cantidad de las Imp relevantes en más de 85% en 48 horas (Figuras 2A-C). Estas reducciones de la expresión no afectaron la localización citoplásmica de JNK1/2 o p38α/β endógenos en las células en reposo. Sin embargo, la reducción de la expresión de Imp3/7/9, pero no de Imp5 o el control por Ip, modulan fuertemente el transporte nuclear estimulado de las MAPK examinadas. La reducción de la expresión de Imp3 inhibió la translocación en ~80% de las células, mientras que el ARNip de Imp7 e Imp9 impidió la translocación solo en ~60%. Para estudiar adicionalmente el efecto de la reducción de la expresión de Imp3/7/9 sobre la translocación de JNK1/2 o p38α/β, los autores de la presente invención examinaron la fosforilación de los sustratos de JNK/p38 nucleares c-Jun, ATF-2 y MEF2A. De manera importante, los tres ARNip inhibieron significativamente la fosforilación inducida por estímulos de estos factores de transcripción, aunque el efecto del ARNip de Imp3 fue algo mayor al de Imp7/9 (Figura 2C). No se detectaron efectos sobre la diana de ERK C-Myc (Figura 11) u otros efectos inespecíficos de los ARNip en ninguna otra proteína examinada. Por lo tanto, parece que las tres Imp son importantes para la translocación tanto de JNK1/2 como de p38 α/β, aunque el papel de Imp3 podría ser más general.

Para participar en el proceso de translocación, es posible que a diferencia de Impα/β, las Imp 3/7/9 cambien su localización tras la estimulación. De hecho, se encontró (Figuras 12A-B) que la estimulación de las células HeLa y HB2 causa un cambio significativo de Imp3/7/9 del citoplasma a la región perinuclear (Imp3) o al núcleo (Imp7/9). La localización de Impβ no se vio afectada en absoluto después de la estimulación. Los resultados sugieren que las tres Imp son importantes para la translocación nuclear de JNK1/2 o p38α/β, que pueden actuar indistintamente, o probablemente a través de la formación de complejos de translocación. Finalmente, como sería de esperar por la dependencia de las Imp de tipo β en la actividad de Ran, utilizando ARNip de Ran se encontró que la translocación de JNK y p38 es de hecho dependiente de Ran (Figura 13). Estas observaciones sugieren un papel para las Imp de tipo β en los procesos inducidos por estrés y mitogénicos, implicándolos en la regulación de la transcripción sobre la estimulación celular.

Ejemplo 4

JNK1/2 y p38α/β interactúan con Imp7 o Imp9, a través de una secuencia N-terminal específica

Para obtener una mejor comprensión de la interacción MAPK-Imp, los autores de la presente invención estudiaron la interacción in vitro de GST-p38α/β y GST-JNK1/2 con las Imp de extractos de células HeLa no estimuladas o estimuladas. Aunque las MAPK interactuaron con Imp7/9 de células estimuladas como se esperaba, no se detectó interacción *in vitro* con Imp3 (Figura 3A). Además, el experimento CoIP reveló que Imp 3 no es necesaria para la interacción de JNK y p38 con Imp7/9 (Figura 3B frente a Figura 1). Estos resultados muestran que JNK y p38 interactúan directamente con Imp7 o Imp9 solamente, y no requieren Imp3 para esta interacción.

Los autores de la presente invención emprendieron a continuación la identificación del sitio en JNK y p38 que media la interacción con Imp7 e Imp9. Para este propósito, se suprimieron varias regiones en las regiones C y N terminales adyacentes al dominio quinasa de p38α, y estas deleciones se examinaron para determinar su efecto sobre la localización subcelular y la interacción con importina de la quinasa (Figuras 14A-C). Ambas deleciones del dominio N y C terminales dieron como resultado la localización citosólica de p38α, sin embargo, solo la deleción N terminal (AA 1-30) evitó la translocación estimulada y las interacciones de Imp7/9, lo que indica la importancia de esta región para la translocación. Con el fin de localizar la secuencia exacta que se requiere para la translocación, los autores de la presente invención subdividieron adicionalmente el extremo N, eliminando los primeros 7 o 20 residuos de la quinasa. Es importante destacar que estas dos mutaciones adicionales no tuvieron ningún efecto sobre la translocación o la unión a Imp7/9, sugiriendo fuertemente que la secuencia importante se encuentra dentro de los residuos 20-30 de p38α.

Para estudiar adicionalmente el papel de la región identificada en la translocación nuclear de las MAPK, los autores de la presente invención sintetizaron un péptido miristoilado de 14 aminoácidos, basado en la secuencia de residuos 21-34 de p38α (secuencia de péptidos: Myr-PERYQNLSPVGSGA - SEQ ID NO: 16). Dado que esta región es similar en p38β así como en JNK1 y JNK2, se formuló la hipótesis de que debería competir con la interacción de las cuatro

MAPK con Imp7/9 y de ese modo afectar su translocación nuclear. De hecho, cuando este péptido se aplicó a células Hela antes de la estimulación, evitó la translocación nuclear (Figura 4A), y las interacciones Imp7/9 (Figura 4B) de las MAPK examinadas. Por lo tanto, estos resultados verifican claramente la importancia de los residuos N-terminales en las isoformas JNK/p38 en la regulación de su translocación nuclear, y sugieren que este péptido puede usarse para estudiar el papel de la translocación y su participación clínica.

Ejemplo 5

El complejo Imp7/9-JNK/p38 interactúa con Imp3 fosforilada

La interacción de las MAPK con Imp3/7/9 en las células (Figuras 1A-B) planteó la cuestión de cuál es el papel de cada una de las Importinas en el proceso de translocación nuclear. El hecho de que el ARNip de Imp3 tuviera un efecto mayor que el de Imp7/9 (Figuras 2A-C), que Imp3 no interaccionara directamente con JNK1/2 o p38α/β in vitro (Figura 3A), y que Imp3 no fuera requerido para las interacciones de MAPK con Imp7/9 (Figura 3B) llevó a la hipótesis de que las MAPK se unen a Imp7 o Imp9, y a continuación Imp3 se une a los dímeros para permitir su translocación nuclear.

Con el fin de examinar esta hipótesis y establecer una formación compleja entre Imp3/7/9 endógeno, los autores de la presente invención verificaron estas posibles interacciones por medio de PLA. No se detectó interacción entre ninguna de las Importinas examinadas en células HeLa en reposo (Figuras 5A, B). Sin embargo, esto se modificó drásticamente con la estimulación, lo que indujo la interacción entre Imp3 y Imp7 o Imp9, pero no entre Imp7 e Imp9. Estos resultados fueron confirmados por experimentos de CoIP de extractos estimulados de células HeLa también (Figura 5C). Curiosamente, la interacción in vitro de Imp7 e Imp9 recombinantes con Imp3 de células no estimuladas o estimuladas (Figura 5D) demostró que Imp3 se modifica tras la estimulación para permitir la interacción. El tratamiento del extracto celular con fosfatasa alcalina (CIP) redujo la interacción, lo que indica que la interacción con Imp7/9 requiere la fosforilación de Imp3.

Ejemplo 6

Análisis de filtración en gel de las interacciones MAPK-Imp

Para validar adicionalmente este mecanismo, se realizó la filtración en gel para separar las proteínas no unidas de los complejos de mayor PM. De hecho, Imp3/7/9 de las células en reposo apareció en su PM monomérico esperado (~90 kDa para Imp3 y ~120 kDa para Imp7/9; Figura 5A). La Imp3 también apareció en un pico de ~160 kDa, que puede representar un homo- o hetero-dímero/trímero de la proteína. Curiosamente, se detectó una pequeña cantidad de las tres Imp no estimuladas en otro pico de 220-400 kDa (designado como ~280 kDa) (Figura 6A). Este pico de ~280 relativamente amplio puede corresponder a un dímero de Imp, un heterotrímero que contiene un dímero de Imp con proteínas adicionales de 30-80 kDa (p.ej. MAPK) o un complejo de las Imp con cualquier proteína de alto PM (100-200 kDa). Es importante destacar que la cantidad relativa de las Imp en los diversos picos se modificó drásticamente en extractos de células estimuladas. Por lo tanto, la cantidad de Imp3/7/9 en los picos de PM más bajos disminuyó significativamente, mientras que la de los picos más altos aumentó de forma correspondiente. En paralelo, JNK y p38 cambiaron de un pico agudo a ~40 kDa, a un pico muy amplio después de la estimulación (Figuras 15A-B).

Con el fin de determinar que los picos de PM más altos de las Imp y MAPK se forman, al menos parcialmente, mediante la interacción entre MAPK y dímeros de Imp, se realizaron experimentos de CoIP. Como se esperaba, no se detectó asociación entre los componentes en los picos de ~120 kDa (Figura 6B); esto también se verificó para el pico de mayor PM (~160 kDa) de Imp3. Por otro lado, Imp3/7/9 CoInmunoPrecipitaron las proteínas JNK y p38 del pico de 280 kDa estimulado. Además, Imp3 CoInmunoPrecipitó tanto Imp7 como Imp9, mientras que no se detectó interacción entre Imp7 e Imp9. La falta de interacción entre Imp7 e Imp9 también se observó en fracciones de mayor PM, lo que indica claramente que no se forman trímeros de Imp3/7/9 después de la estimulación. No se detectaron diferencias reproducibles en la afinidad de unión de las MAPK/Imp bajo las distintas estimulaciones, lo que indica actividades redundantes de los dímeros con MAPK. Estos resultados apoyan adicionalmente la noción actual de que tras la estimulación, Imp3 interactúa con los dímeros de Imp7/MAPK o Imp9/MAPK, y los heterotrímeros son necesarios para la translocación adecuada al núcleo.

Ejemplo 7

Uso de los péptidos miristoilados para el tratamiento de la colitis

Materiales y métodos

Cultivo celular y transfección: Las células HeLa se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un suplemento de L-glutamina2 mM de, Pen/Strep al 1% y suero bovino fetal al 10% (FBS).

Microscopía de inmunofluorescencia: Las células se fijaron en paraformaldehído al 3% en PBS (20 min, 23°C), y se incubaron con albúmina de suero bovino al 2% (BSA) en PBS (15 min, 23°C), seguido de permeabilización con Triton X-100 (0,1% en PBS, 5 min, 23°C). Las células se incubaron con los Ab primarios (60 min, 23°C), se lavaron

tres veces con PBS y se incubaron con Ab secundario conjugado con rodamina (60 min, 23°C) y DAPI. Los portaobjetos se visualizaron mediante microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40) o microscopio confocal de disco giratorio (Zeiss, Cell observer SD, aumento x100). La corrección del fondo y el ajuste de contraste de los datos brutos se realizaron utilizando Photoshop (Adobe, CA, EE.UU.).

Construcciones de ADN y mutaciones: Se clonaron GFP-JNK1/2, p38α/β en pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA). Las secuencias de JNK1/2 y p38α/β se amplificaron a partir de ADNc de células HeLa y se flanquearon con EcoRI/BamHI para JNK2 y p38β, y con XhoI/BamHI para JNK1 y p38α. Las mutaciones puntuales de JNK1/2 y p38α/β se realizaron mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se clonaron GST-JNK1/2, p38α/β en el vector pGEX-2T (GE healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y se flanqueron con los sitios de restricción SpeI/NotI. La mutación de deleción de N y C-terminal de GFP-p38α se realizó utilizando cebadores específicos para construir la mutación por deleción N-terminal Δ7/Δ20/Δ30 o la mutación por deleción C-terminal Δ40. Las Importinas 3, 7 y 9 se clonaron en pEGFP-C. Las Importinas 7 y 9 se amplificaron a partir de ADNc de células HeLa utilizando cebadores específicos flanqueados por los sitios de restricción BamHI/SalI para la Importina 7 y XhoI/SalI para la Importina 9. La Importina 3 se adquirió a partir de la colección de plásmidos del depósito Forchheimer, y se amplificó utilizando cebadores específicos flanqueados por sitios de restricción XhoI/EcoRI.

Péptido miristoilado: El péptido miristoilado se diseñó específicamente (péptido 2.0, VA, EE.UU.). Secuencias peptídicas: KPERYQNLSPVGSGA - SEQ ID NO: 9 (residuos 21-34 de p38α) y KPERYQNLSPVAAAA (SEQ ID NO: 10).

CoIP: Los extractos celulares se produjeron e incubaron durante 2 horas (4°C, con rotación) con esferas de A/G-agarosa preligadas con Ab específicos (1 hora, 23°C). Las esferas de A/G unidas se lavaron, se resuspendieron (1,5 X de tampón de muestra), se hirvieron y se sometieron a transferencia Western.

Ensayo de ligadura de proximidad (PLA). Las interacciones proteína-proteína se detectaron con el kit Duolink PLA; Olink Bioscience), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron, fijaron y permeabilizaron como se describe. Las muestras se incubaron a continuación con Ab primarios contra dos proteínas examinadas (60 min, 23°C), se lavaron (Tris HCl 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%), y a continuación se incubaron con sondas específicas (60 min, 37°C), seguido de tinción con DAPI para visualizar los núcleos y lavado (Tris HCl 0,2 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M). La señal se visualizó como puntos fluorescentes distintos mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, aumento x40). La corrección del fondo, el ajuste del contraste y la cuantificación de la señal de fluorescencia se realizaron utilizando Photoshop e ImageJ.

Ensayo de interacción in vitro: Los extractos celulares se produjeron como se describe y se incubaron durante 2 horas (4°C) con esferas de A/G-agarosa preligadas con Ab específicos (1 hora, 23°C). Las esferas de A/G unidas se lavaron secuencialmente con tampón RIPA, dos veces con LiCl 0,5 M y dos veces con Tampón A. Las esferas de A/G unidas se resuspendieron a continuación en Tampón A que contenía BSA al 0,01% y se dividieron en alícuotas. Las proteínas etiquetadas con GST se incubaron con las esferas durante 2 h (4°C, con rotación) y a continuación se lavaron y resuspendieron en 1,5 X tampón de muestra y se hirvieron.

Ensayo de fosfatasa in vitro: Las células HeLa se cultivaron hasta la subconfluencia, se privaron de suero (FBS al 0,1% durante 16 horas) y a continuación se trataron con estímulos u otros fármacos. Los extractos celulares se produjeron como se describe y se incubaron durante 2 horas (4°C, con rotación) con esferas de A/G-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) pre-ligadas con Ab específicos (1 h, 23°C). Las esferas de A/G unidas se lavaron secuencialmente una vez con tampón RIPA, a continuación dos veces con LiCl 0,5 M y dos veces con Tampón A. La muestra de esferas de A/G unida, originada a partir de las células estimuladas, se incubó después con Fosfatasa Intestinal de Ternera (37°C, 1 hora, NEB, MA, EE.UU.). A continuación se lavó. Las muestras se resuspendieron después en Tampón A que contenía BSA al 0,01% y las proteínas etiquetadas con GIC divididas en alícuotas se incubaron con esferas (4°C, 2 h), a continuación se lavaron y se resuspendieron en tampón de muestra y se hirvieron.

Fraccionamiento subcelular: El fraccionamiento subcelular se realizó de la siguiente manera, las células recogidas se resuspendieron en 200 µl de tampón H que contenía Nonidet P-40 al 0,1%. Los productos lisados se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron inmediatamente como antes para producir sobrenadantes que contenían la fracción citosólica. Las proteínas nucleares se extrajeron resuspendiendo los sedimentos nucleares en 200 µl de tampón de extracción, esperando en hielo durante 5 minutos, sometiendo a sonicación breve (2 x 5 seg, 40 W, 4°C), mezclando vigorosamente y centrifugando. La concentración de proteína se determinó mediante reactivo de ensayo de proteína de Coomassie (Pierce). Las fracciones citosólica y nuclear se sometieron a Transferencia Western.

Filtración en gel: Las células HeLa se privaron de suero (como anteriormente) y a continuación se estimularon con anisomicina (Anis, 0,5 µg/ml, 15 min) y TPA (250 nM, 15 min), o se dejaron sin tratar (NT). Los extractos celulares (25 mg de cada tratamiento) se cargaron en una columna de exclusión por tamaño 16/60 superdex 200 (velocidad de flujo 1 ml/min), y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones se analizaron utilizando transferencia Western con los Ab apropiados.

Análisis estadístico: Los datos se expresan como media ± E.T. La evaluación estadística se llevó a cabo utilizando

el análisis funcional y la prueba t de Student (dos colas) para evaluar las diferencias entre el control y los resultados experimentales. Los valores de p <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Experimento in vivo: Se pesaron 21 ratones macho C57BL y a continuación se les inyectó (IV) péptido (15 mg/Kilo), péptido de control negativo "scramble" (15 mg/Kilo) o DMSO (2%). Veinticuatro horas después de la inyección, el agua potable de los ratones se reemplazó por agua que contenía DSS (1,25%), se inyectaron péptido, péptido de control negativo o DMSO cada cuarenta y ocho horas. Los ratones se sacrificaron siete días después del reemplazo del agua potable, y la colitis se evaluó mediante endoscopia y peso de los ratones.

Resultados

Los autores de la presente invención examinaron la distribución intracelular y la estabilidad del péptido miristoilado utilizando un péptido miristoilado conjugado con FITC, y descubrieron que el péptido penetraba eficazmente en las células y permanecía en el citoplasma incluso después de 24 horas (Figura 16). A continuación, los autores de la presente invención demostraron el posible uso terapéutico del péptido en un modelo de colitis inducida por DSS. Los ratones tratados con el péptido demostraron una reducción de la colitis inducida por DSS, en comparación con los ratones tratados con el péptido de control (mostrada como pérdida de peso promedio y número de lesiones en el colon (Figuras 17A-C)). Sin embargo, este péptido se solapa parcialmente con el bien conocido dominio de quinasa I, un dominio proteico conservado. Para superar este problema, los autores de la presente invención modificaron el péptido sustituyendo esta región por residuos de Ala (Figuras 18A-B). A continuación, demostraron que este péptido recién diseñado inhibía la interacción de p38 con Imp7 y evitaba la translocación nuclear inducida por estimulación de las MAPK JNK y p38 sin afectar a la actividad quinasa de MAPK dependiente de estimulación (Figuras 19-21).

Listado de secuencias

Yeda Research and Development Co. Ltd.
Seger, Rony
Zehorai, Eldar

<120> USO DE PÉPTIDOS INHIBIDORES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

<130> 59108

<150> US 61/815,805
<151> 2013-04-25

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 1
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val
1 5 10

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 2
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly
1 5 10

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 3
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 4
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 5
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 6
Lys Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly Ala
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 7
Lys Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 8
Lys Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val
1 5 10

<210> 9
<211> 15
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 9
Lys Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly Ala
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 10
Lys Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 11
Lys Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 12
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 13
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 14
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 15
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEA
<223> Péptido miristoilado

<400> 16
Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1 (PERYQNLSPV), comprendiendo el péptido una actividad de direccionamiento nuclear, no teniendo el péptido más de 20 aminoácidos de longitud, siendo el péptido ser capaz de evitar la translocación nuclear de P38α.

2. El péptido aislado de la reivindicación 1, que comprende la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 8.

3. El péptido aislado de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 (PERYQNLSPVG), SEQ ID NO: 3 (PERYQNLSPVGS), SEQ ID NO: 4 (PERYQNLSPVGSG) y SEQ ID NO: 5 (PERYQNLSPVGSGA), SEQ ID NO: 6 (KPERYQNLSPVGSGA) y SEQ ID NO: 7 (KPERYQNLSPVAAAA).

4. El péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que está miristoilado.

5. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o un trastorno inmunitario.

6. El péptido de la reivindicación 5, en donde dicho trastorno inmune es un trastorno autoinmunitario.

7. El péptido de la reivindicación 5, en donde dicho trastorno inflamatorio es colitis.

8. El péptido de la reivindicación 5, en donde dicho trastorno inflamatorio es cáncer.

9. Una composición de materia que comprende el péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y una sustancia heteróloga conectada a dicha secuencia de aminoácidos a través de un conector.

10. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

11. Una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 9.

12. Un método ex vivo para el direccionamiento de una sustancia al interior de un núcleo de una célula anfitriona, comprendiendo el método introducir la sustancia en la célula anfitriona, estando la sustancia anclada al péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

13. Un método ex vivo de direccionamiento de una sustancia a un núcleo de una célula anfitriona, comprendiendo el método introducir el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la célula anfitriona, estando dicho péptido conectado a un radical de afinidad capaz de unirse a la sustancia.

14. Una composición farmacéutica que comprende como agente activo el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un portador farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1A

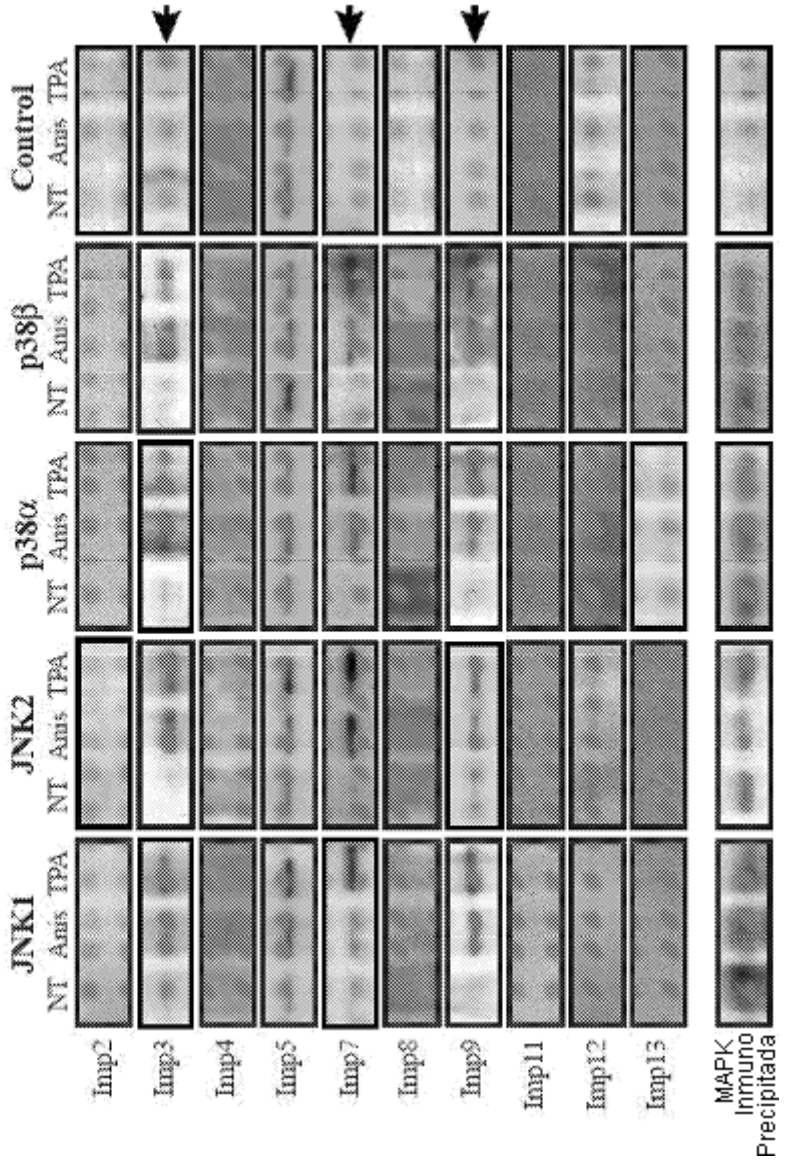

JNK1
JNK2
p38α
p38β
Control
NT
Anis
TPA
Imp2
Imp3
Imp4
Imp5
Imp7
Imp8
Imp9
Imp11
Imp12
Imp13
MAPK Inmuno Precipitada

FIG. 1B

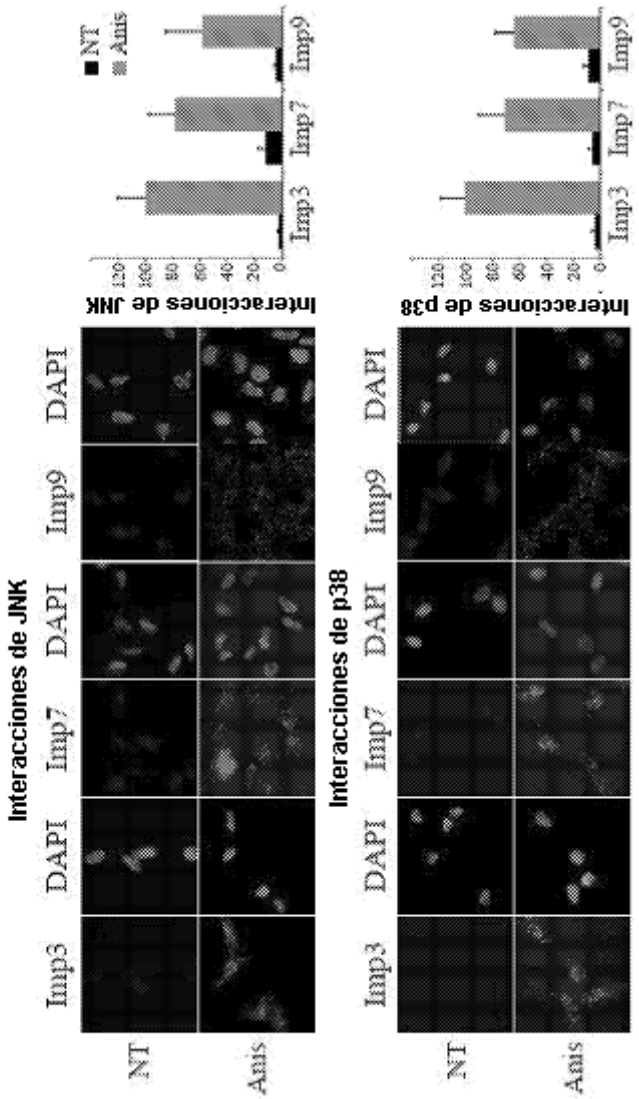

Interacciones de JNK
Imp3
DAPI
Imp7
DAPI
Imp9
DAPI
NT
Anis
Interacciones de JNK
NT
Anis
Imp3
Imp7
Imp9
0
20
40
60
80
100
120
Interacciones de p38
Imp3
DAPI
Imp7
DAPI
Imp9
DAPI
NT
Anis
Interacciones de p38
NT
Anis
Imp3
Imp7
Imp9
0
20
40
60
80
100
120

FIG. 2A

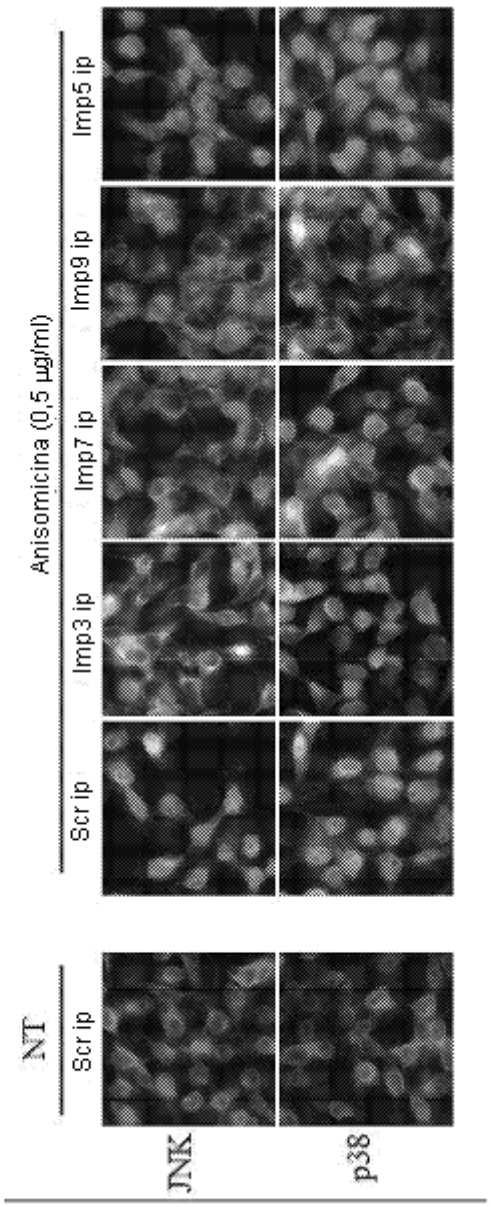

NT
Scr ip
Anisomicina (0,5 µg/ml)
Scr ip
Imp3 ip
Imp7 ip
Imp9 ip
Imp5 ip
JNK
p38

FIG. 2C

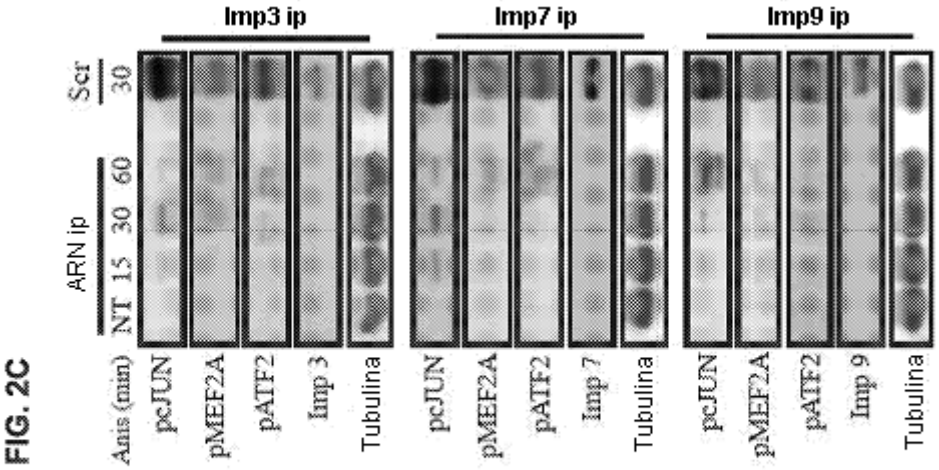

Imp3 ip
Imp7 ip
Imp9 ip
Scr
30
ARN ip
NT 15 30 60
Anis (min)
pcJUN
pMEF2A
pATF2
Imp 3
Imp 7
Imp 9
Tubulina

FIG. 2B

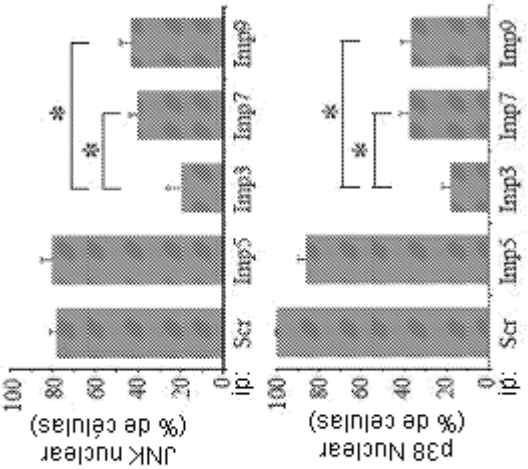

JNK nuclear
(% de células)
p38 Nuclear
(% de células)
ip: Scr Imp5 Imp3 Imp7 Imp9
0 20 40 60 80 100
*

FIG. 3A

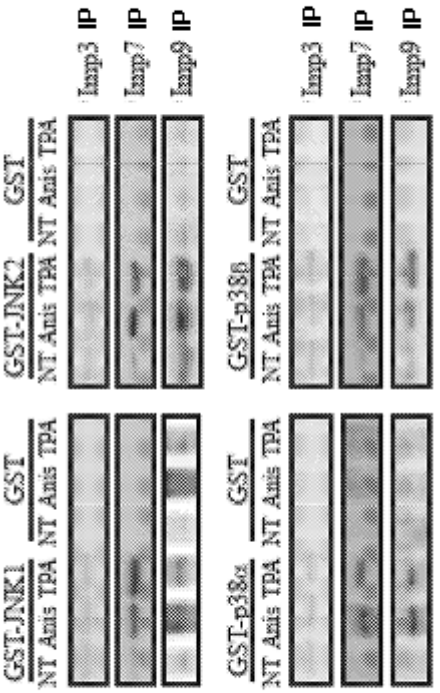
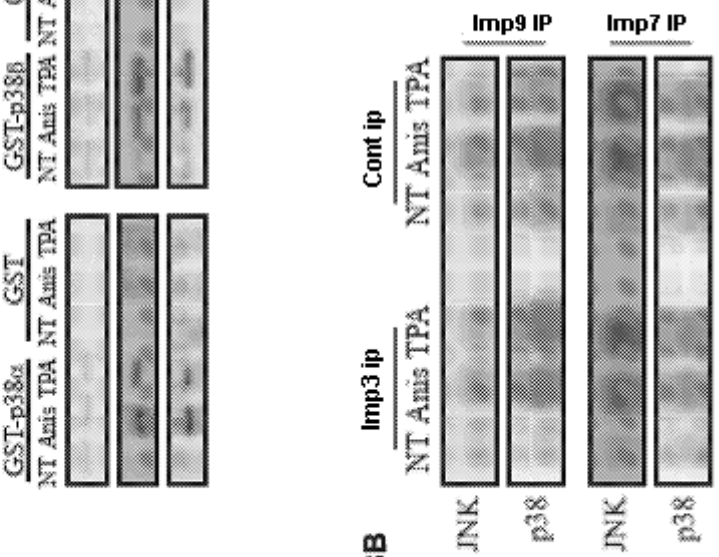

GST-JNK1
GST
NT Anis TPA NT Anis TPA
GST-JNK2
GST
NT Anis TPA NT Anis TPA
Imp3 IP
Imp7 IP
Imp9 IP
GST-p38α
GST
NT Anis TPA NT Anis TPA
GST-p38β
GST
NT Anis TPA NT Anis TPA
Imp3 IP
Imp7 IP
Imp9 IP

FIG. 3B


Imp3 ip
NT Anis TPA
Cont ip
NT Anis TPA
Imp9 IP
Imp7 IP
JNK
p38
JNK
p38
Cont ip
Imp3 ip
Imp3
Tubulina

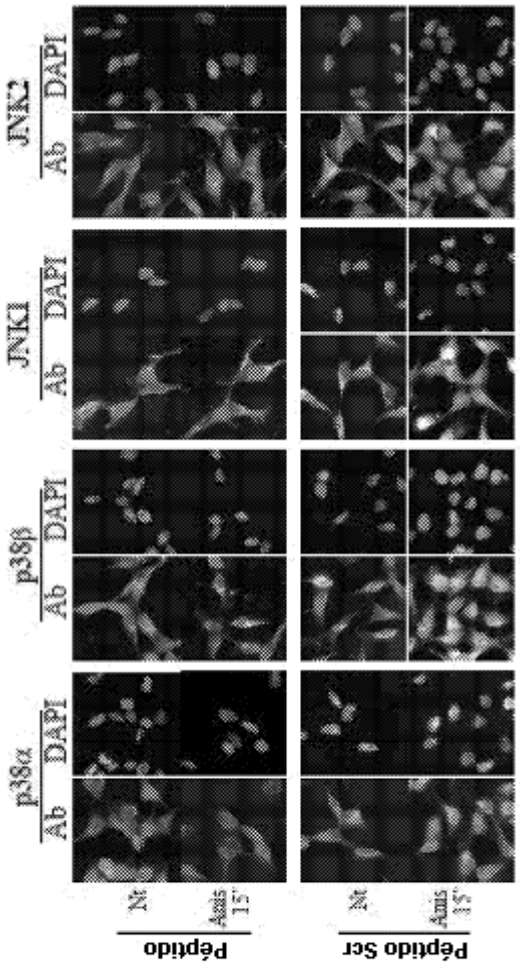

p38α
Ab
DAPI
p38β
Ab
DAPI
JNK1
Ab
DAPI
JNK2
Ab
DAPI
Péptido
Péptido Scr
Nt
Anis 15'

FIG. 4A

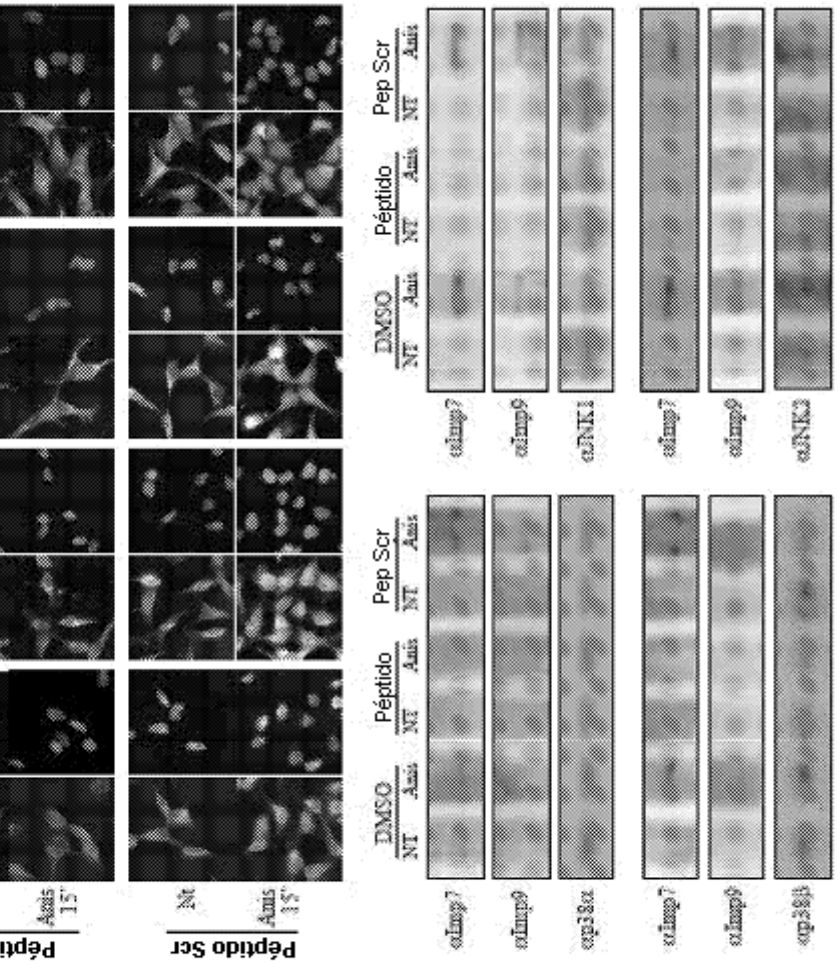
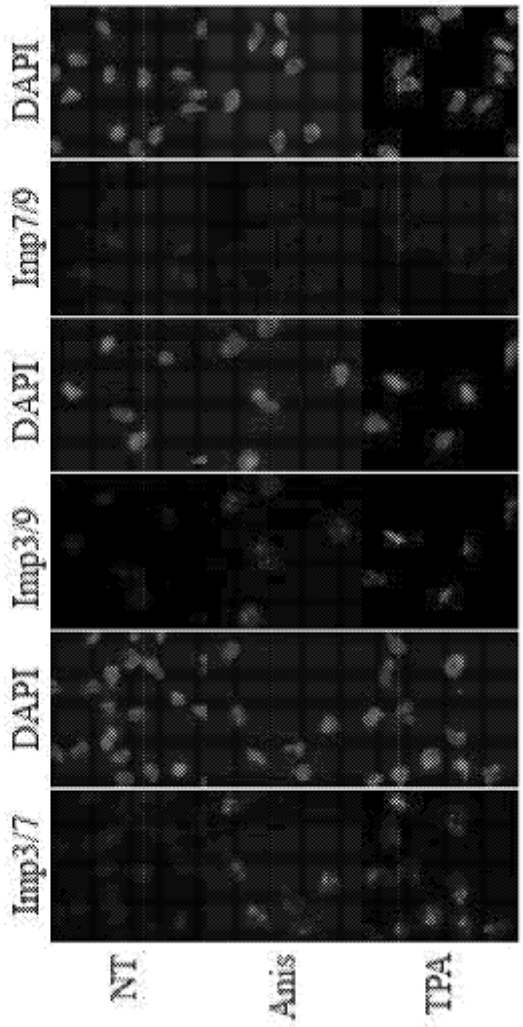

DMSO
Péptido
Pep Scr
NT
Anis
αdmp7
αdmp9
αp38α
αJNK1
αp38β
αJNK2

FIG. 4B

FIG. 5A



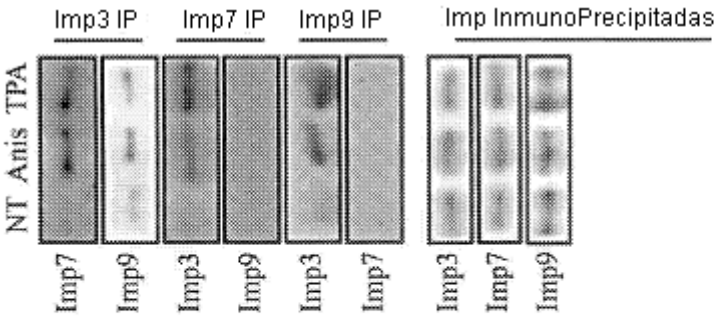
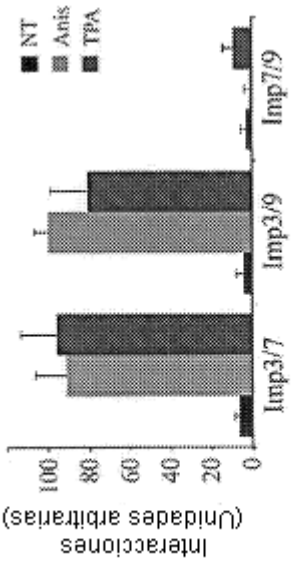


FIG. 5C

FIG. 5B



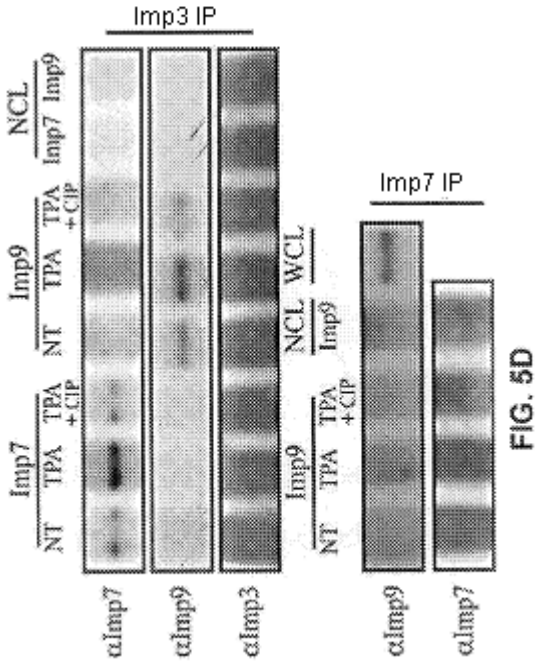


FIG. 5D

FIG. 6A

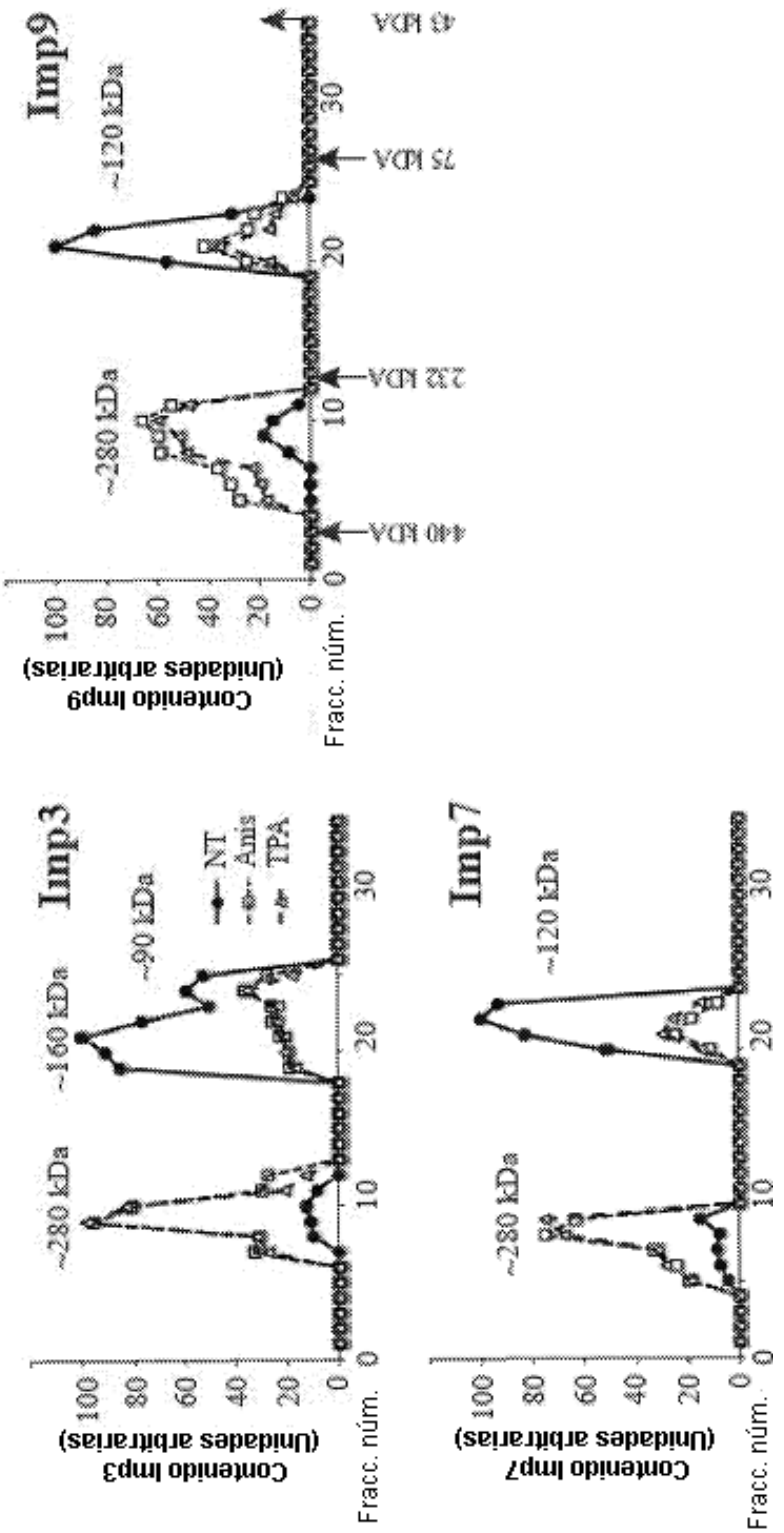

Imp9
~120 kDa
~280 kDa
440 kDA
232 kDA
75 kDA
43 kDA
Contenido Imp9 (Unidades arbitrarias)
Fracc. núm.
Imp3
~280 kDa
~160 kDa
~90 kDa
NT
Amis
TPA
Contenido Imp3 (Unidades arbitrarias)
Fracc. núm.
Imp7
~120 kDa
~280 kDa
Contenido Imp7 (Unidades arbitrarias)
Fracc. núm.

FIG. 6B

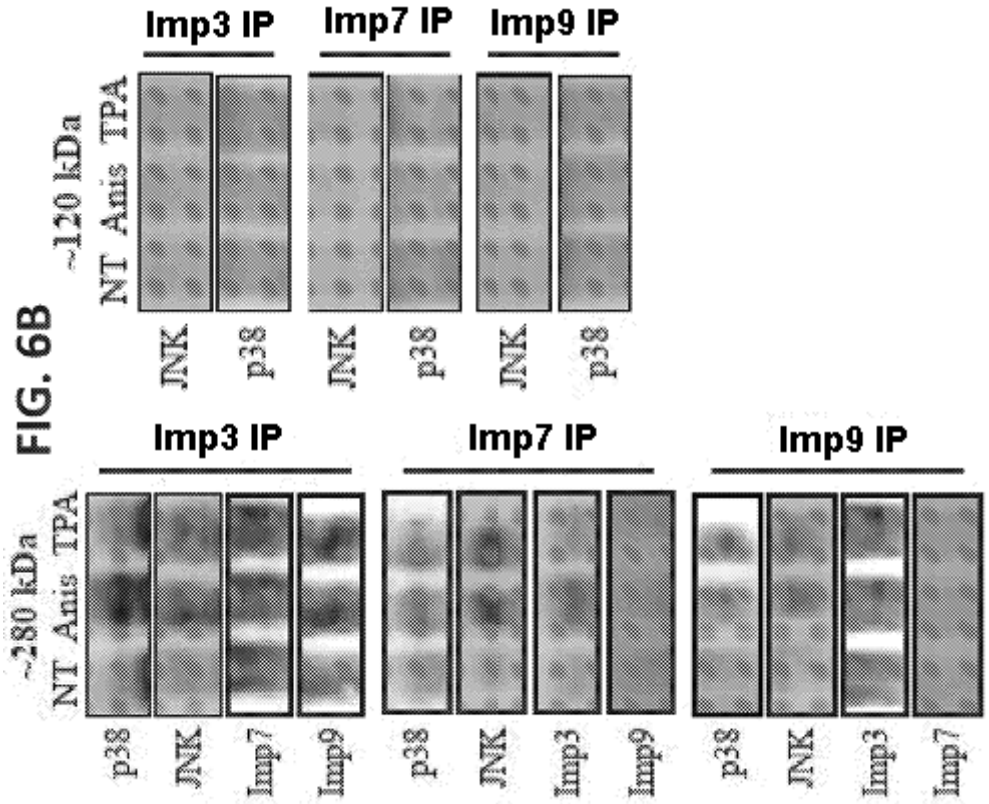

Imp3 IP
Imp7 IP
Imp9 IP
~120 kDa
NT Anis TPA
JNK
p38
JNK
p38
JNK
p38
Imp3 IP
Imp7 IP
Imp9 IP
~280 kDa
NT Anis TPA
p38
JNK
Imp7
Imp9
p38
JNK
Imp3
Imp9
p38
JNK
Imp3
Imp7

FIG. 7A

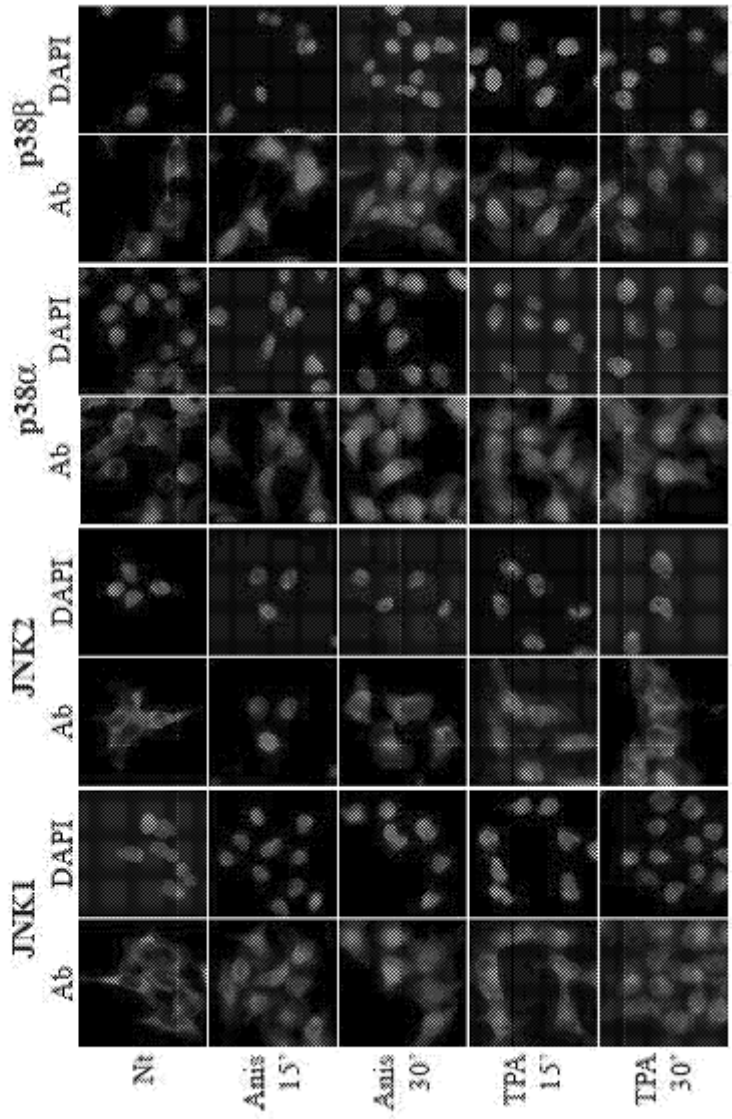


FIG. 7B

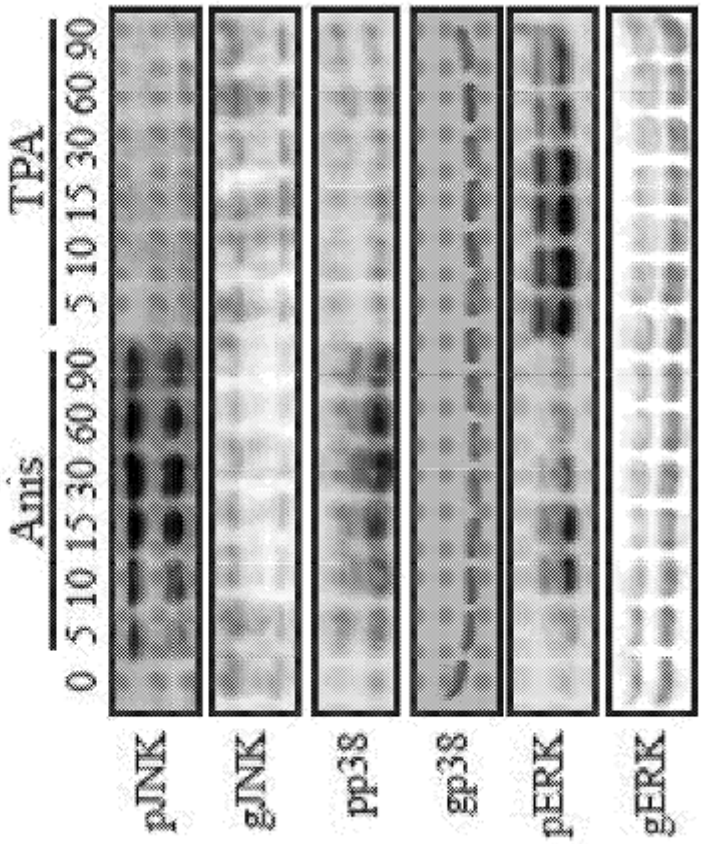

Anis
0 5 10 15 30 60 90
TPA
5 10 15 30 60 90
pJNK
gJNK
pp38
gp38
pERK
gERK

FIG. 8A

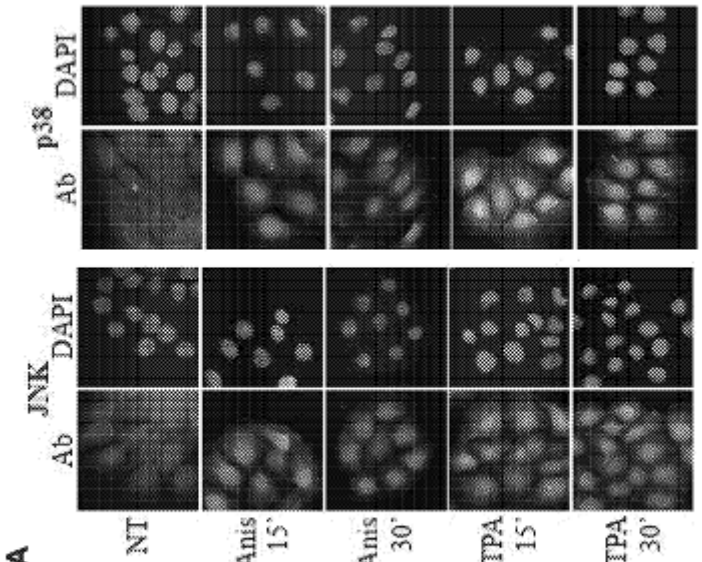

JNK
Ab
DAPI
p38
Ab
DAPI
NT
Anis 15'
Anis 30'
TPA 15'
TPA 30'

FIG. 8B

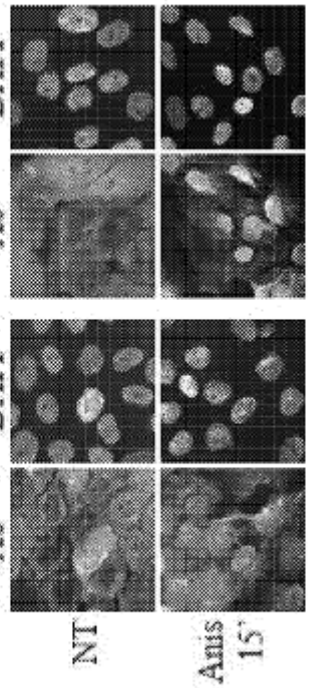

JNK
Ab
DAPI
p38
Ab
DAPI
NT
Anis 15'

FIG. 9

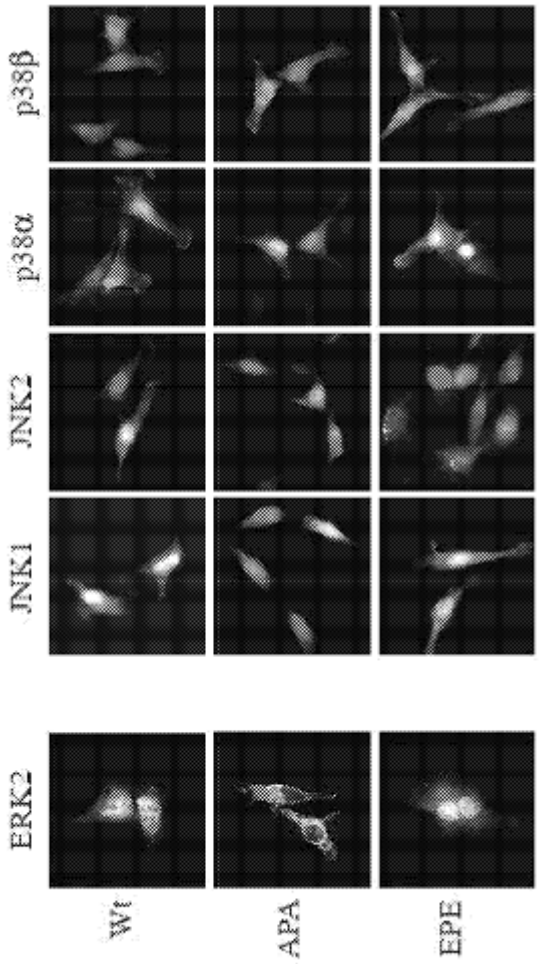


FIG. 10A

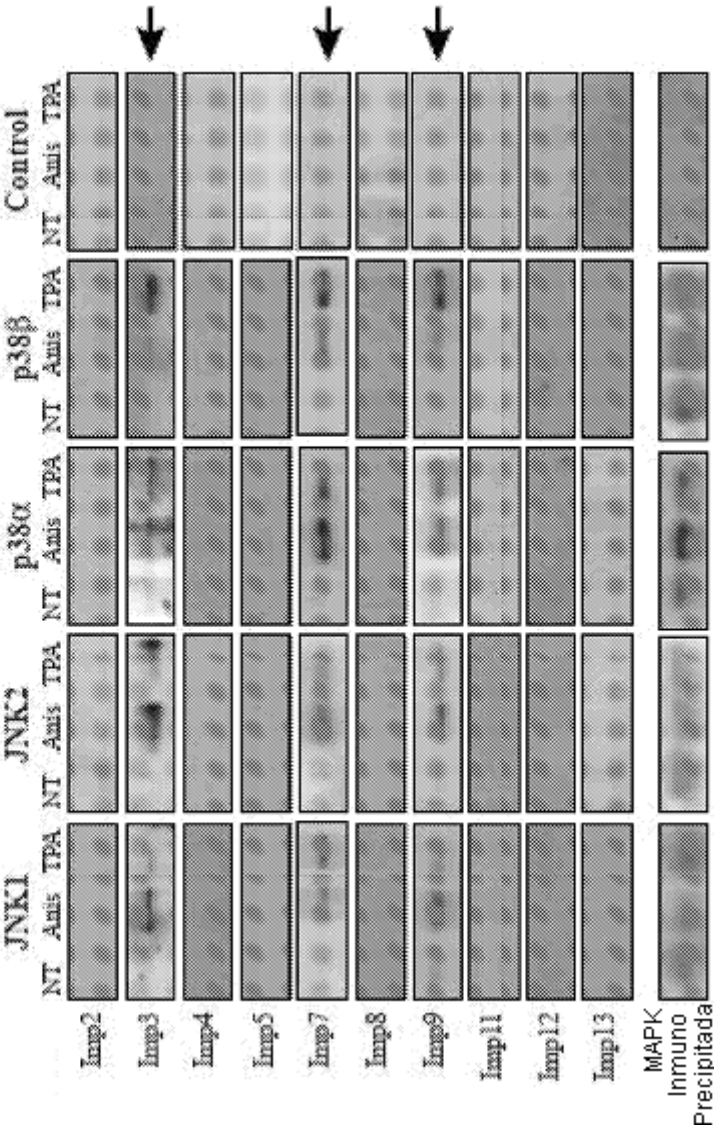

Control
p38β
p38α
JNK2
JNK1
NT
Anis
TPA
Imp2
Imp3
Imp4
Imp5
Imp7
Imp8
Imp9
Imp11
Imp12
Imp13
MAPK
Inmuno
Precipitada

FIG. 10B

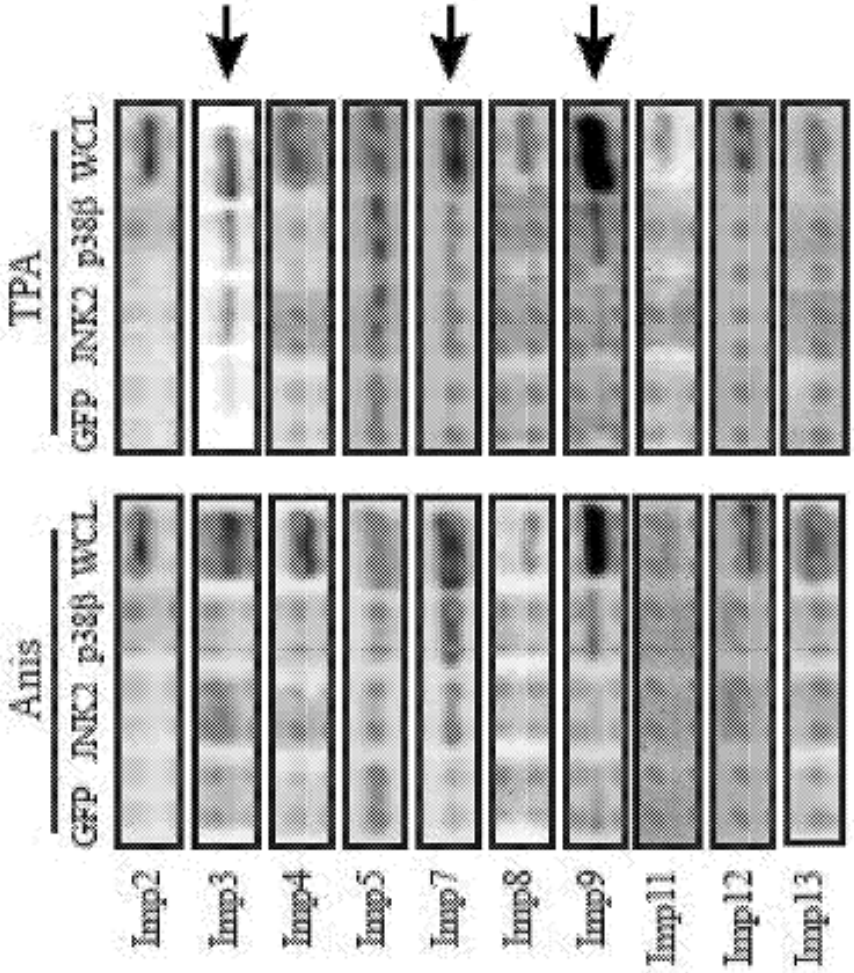

Anis
TPA
GFP
JNK2
p38β
WCL
Imp2
Imp3
Imp4
Imp5
Imp7
Imp8
Imp9
Imp11
Imp12
Imp13

FIG. 11

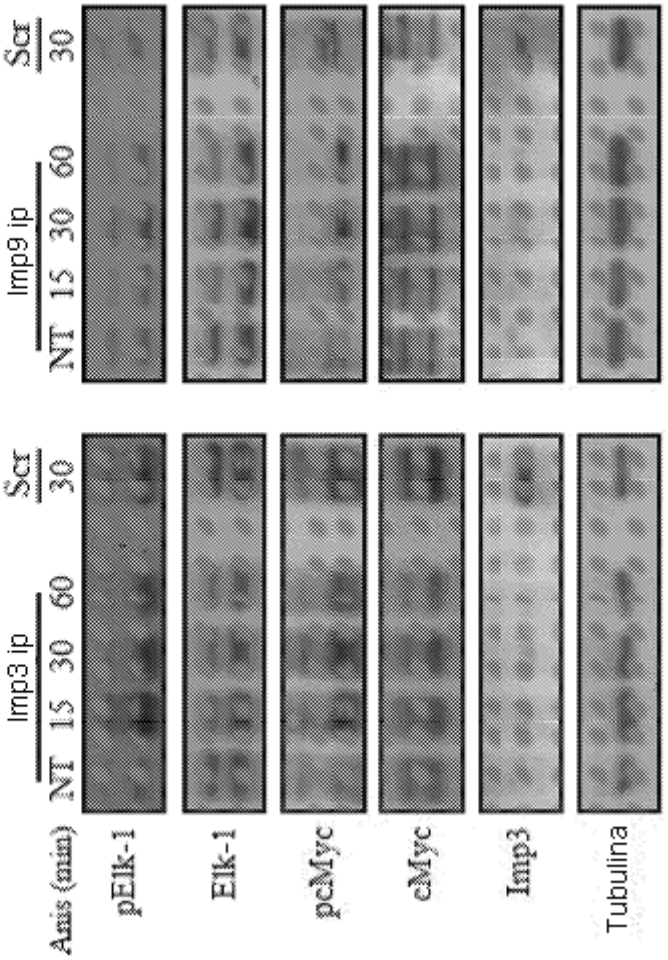

Imp3 ip
Scr
Imp9 ip
Scr
Anis (min)
NT 15 30 60 30
NT 15 30 60 30
pElk-1
Elk-1
pcMyc
cMyc
Imp3
Tubulina

FIG. 12A

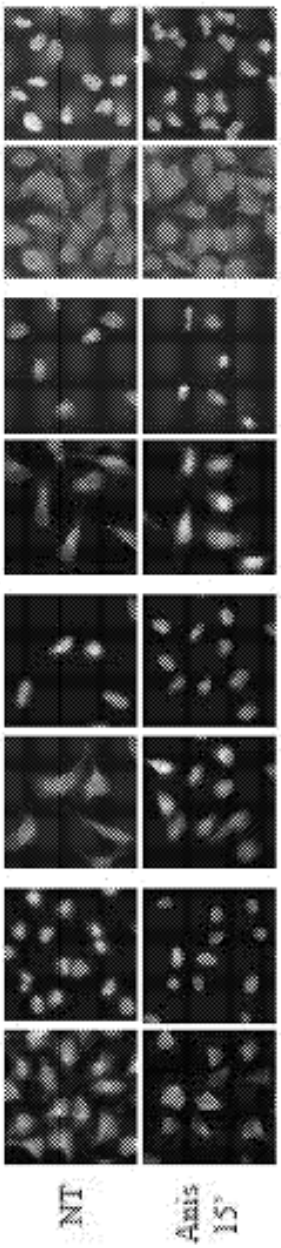


FIG. 12B

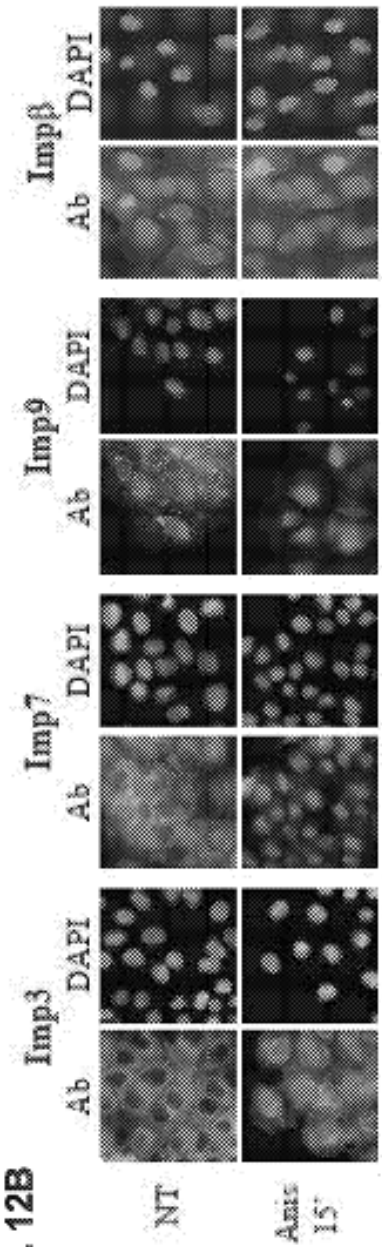


FIG. 13

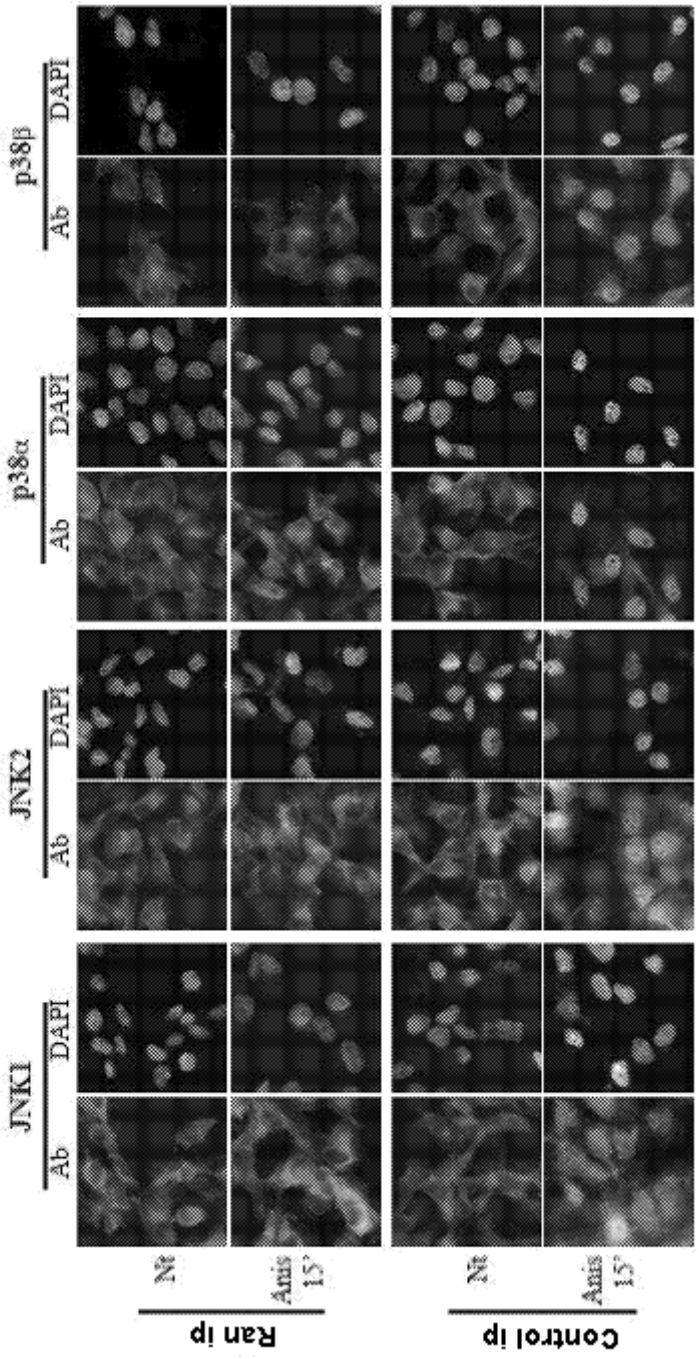

JNK1
Ab
DAPI
JNK2
Ab
DAPI
p38α
Ab
DAPI
p38β
Ab
DAPI
Nt
Anis 15'
Ran ip
Nt
Anis 15'
Control ip

FIG. 14A

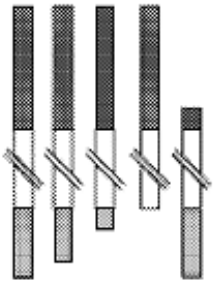


FIG. 14B

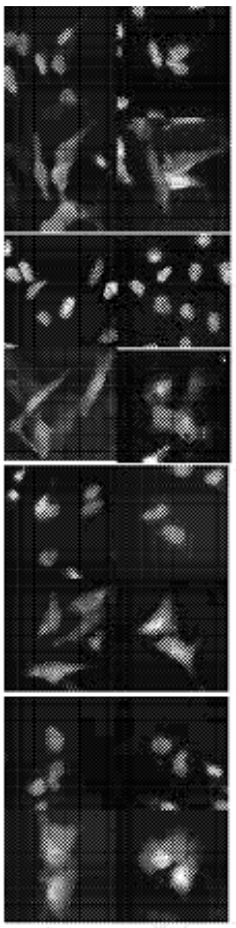
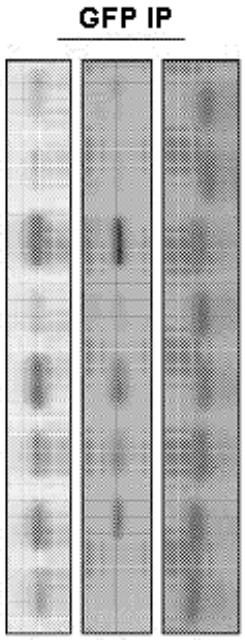


FIG. 14C



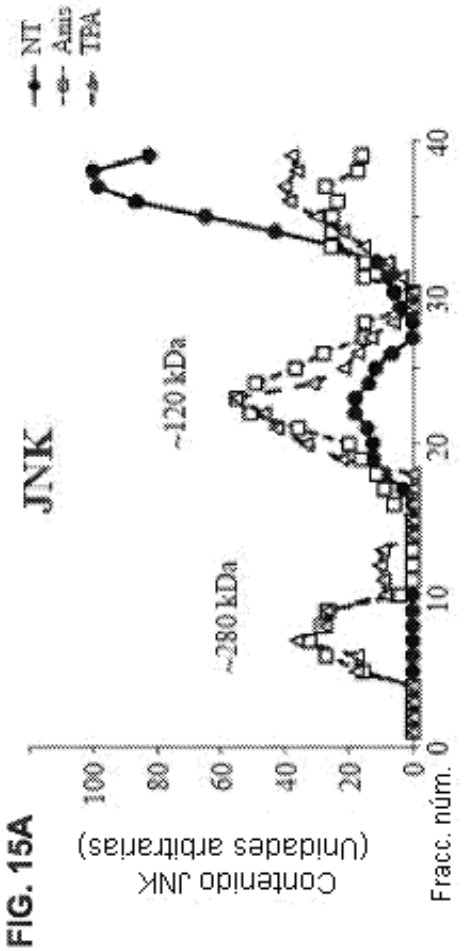


FIG. 15A

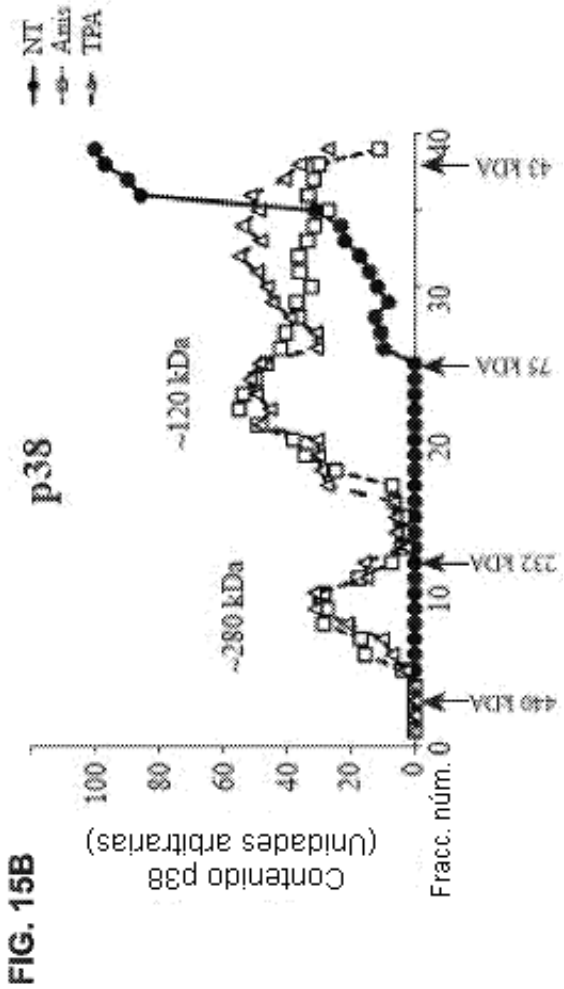


FIG. 15B

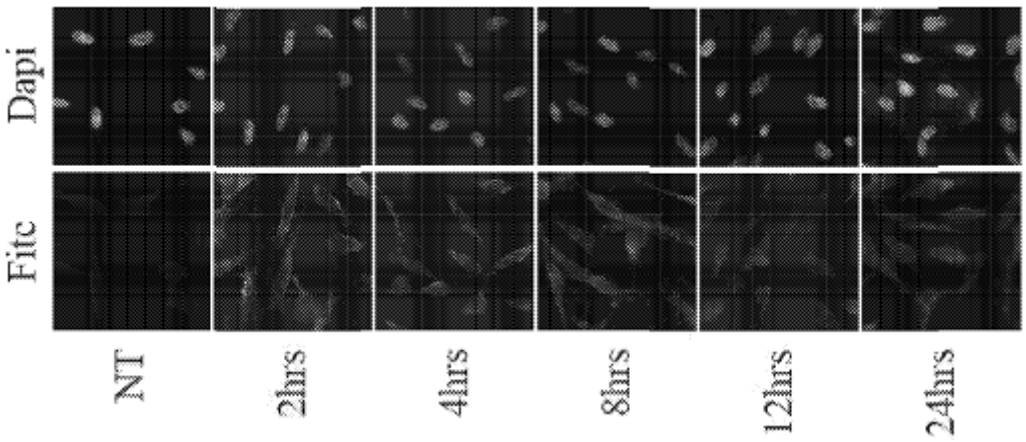


FIG. 16

FIG. 17A

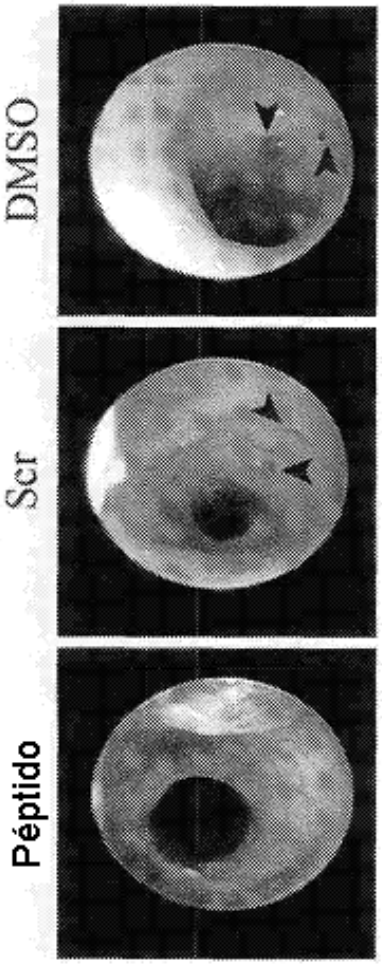


FIG. 17B

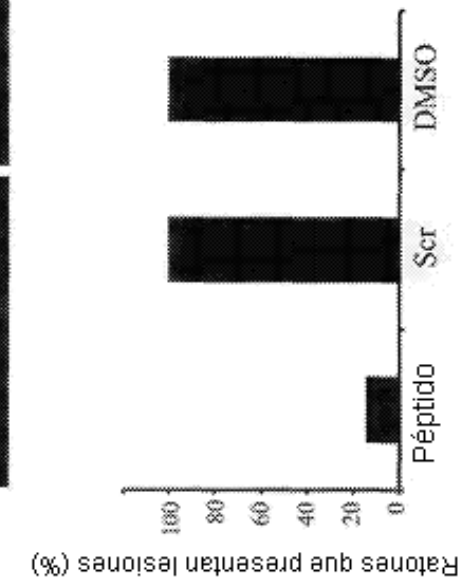


FIG. 17C

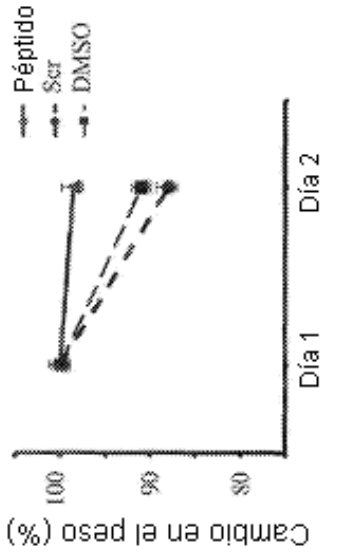
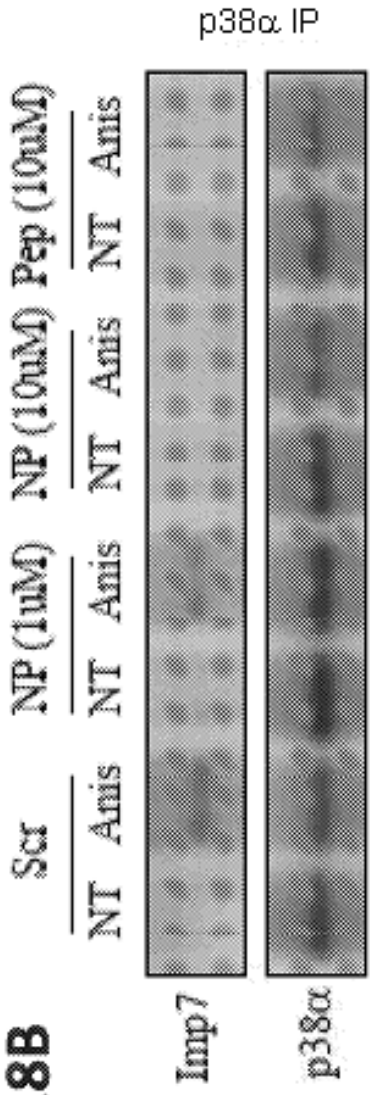


FIG. 18A Péptido - KPERYQNLSPVGSGA
Nuevo péptido - KPERYQNLSPVAAAAA

FIG. 18B



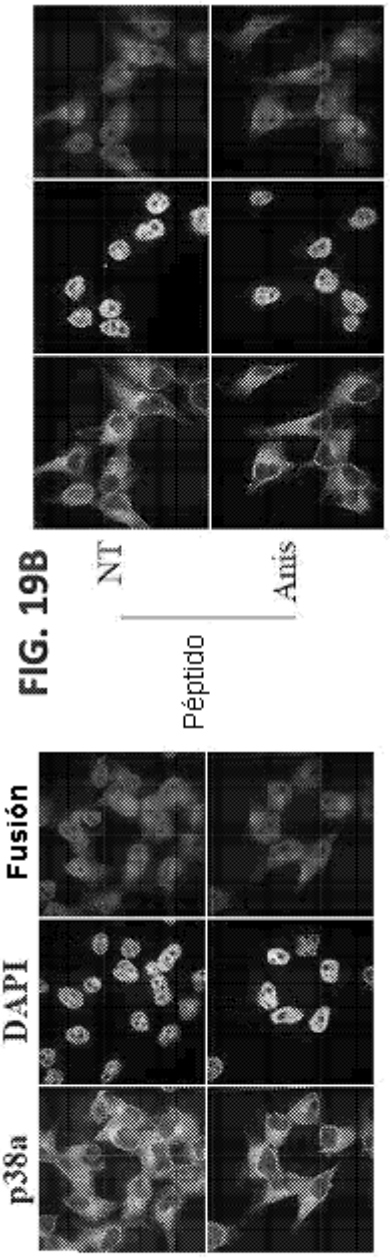


FIG. 19A

FIG. 19B

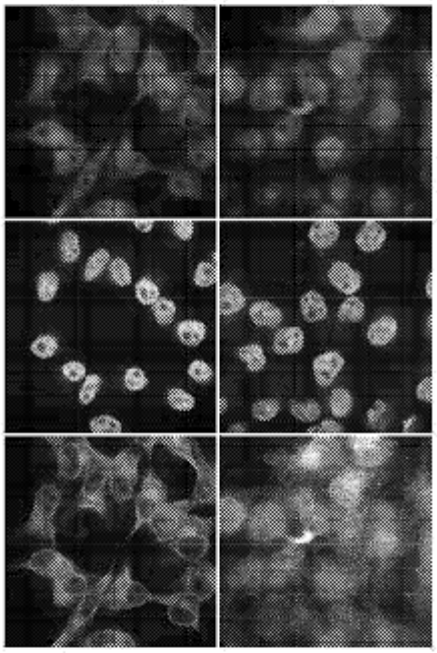


FIG. 19C

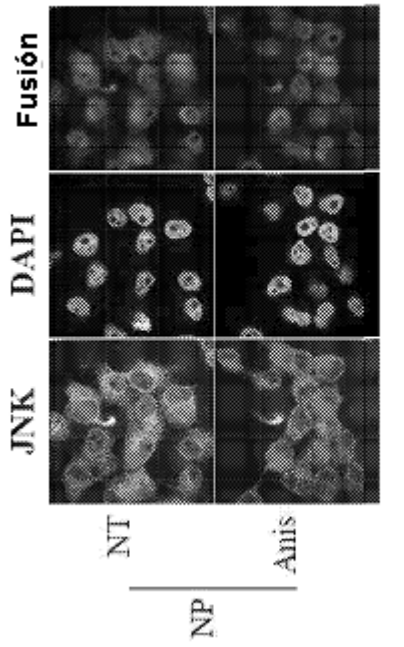


FIG. 20A

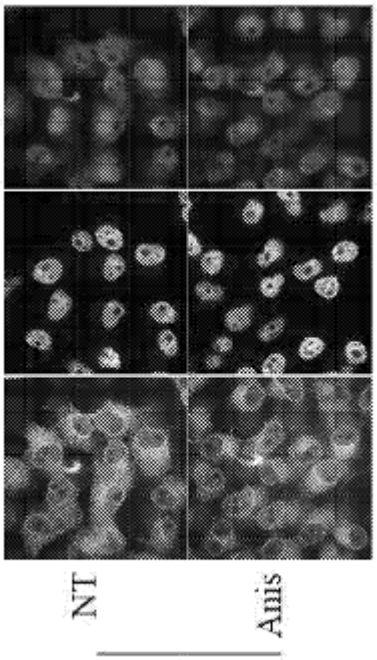


FIG. 20B

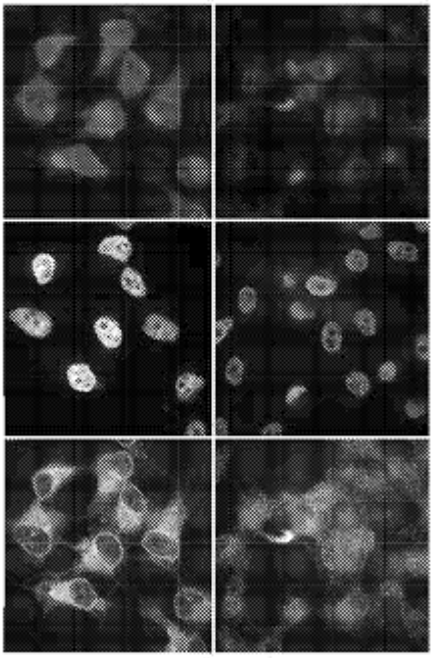
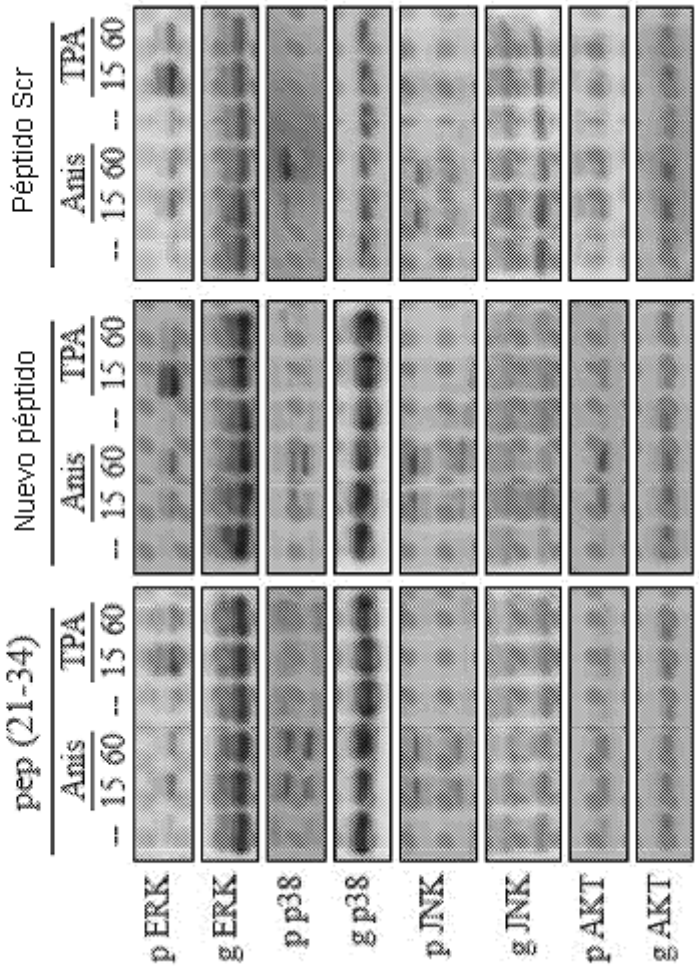


FIG. 20C

FIG. 21


pep (21-34)
Anis
-- 15 60
TPA
-- 15 60
Nuevo péptido
Anis
-- 15 60
TPA
-- 15 60
Péptido Scr
Anis
-- 15 60
TPA
-- 15 60
p ERK
g ERK
p p38
g p38
p JNK
g JNK
p AKT
g AKT