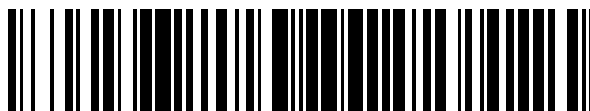


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 995**

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61L 31/08 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

C07K 14/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2012 PCT/EP2012/054285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12123419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012 E 12707813 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2683419**

54 Título: **Moléculas y métodos para la inhibición y detección de proteínas**

30 Prioridad:

11.03.2011 EP 11157842

11.03.2011 US 201161451855 P

18.05.2011 US 201161487595 P

05.08.2011 EP 11176725

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

03.09.2018

73 Titular/es:

VIB VZW (25.0%)

Rijvisschestraat 120

9052 Gent, BE;

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (25.0%);

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN K.U.

LEUVEN R&D (25.0%) y

UNIVERSITEIT GENT (25.0%)

72 Inventor/es:

SCHYMKOWITZ, JOOST y

ROUSSEAU, FREDERIC

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 679 995 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas y métodos para la inhibición y detección de proteínas

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud pertenece al campo de los péptidos funcionales y más particularmente, al campo de la agregación controlada de proteínas. La solicitud divulga moléculas de una estructura peptídica, tal como se define en las reivindicaciones y la memoria descriptiva y métodos para usar dichas moléculas para aplicaciones terapéuticas y para usos diagnósticos, así como en otras aplicaciones, tales como en el campo de la agro-biotecnología y la biotecnología industrial. Las moléculas pueden usarse para curar y/o estabilizar infecciones, tales como enfermedades bacterianas, fúngicas y víricas, pero también son útiles en enfermedades humanas y veterinarias no infecciosas. Las moléculas también pueden usarse para la detección de biomarcadores de proteínas y para el pronóstico y diagnóstico de una serie de enfermedades.

15 **Antecedentes**

La agregación de proteínas está causada por el mal plegamiento y la consiguiente aglutinación de proteínas en aglomerados insolubles. La agregación de proteínas es, esencialmente, un proceso de auto-asociación en el que muchas moléculas de proteína idéntica forman aglomerados de un orden superior de baja solubilidad que en última instancia, se precipitan. Basándose en su morfología macroscópica, se clasifican generalmente como agregados ordenados o desordenados. En condiciones fisiológicas, puede inducirse la formación de agregados amorfos de prácticamente cualquier proteína a una alta concentración; en las mismas condiciones, un conjunto mucho más pequeño de proteínas forma fibras de amiloide ricas en β altamente ordenadas. Sin embargo, a nivel microscópico, la diferenciación entre estos dos tipos de agregados es más sutil. Los agregados amorfos no son solo acumulaciones de proteínas mal plegadas que se unen entre sí mediante contactos hidrofóbicos no específicos. Más bien, también se encuentran normalmente enriquecidos en estructura β cruzada y su propensión a la formación se correlaciona no solo con la hidrofobia, sino también con la propensión a una estructura secundaria y con la carga, lo que sugiere un mecanismo de formación específico (Chiti et al., PNAS 99:16419-16426 (2002); Chiti et al., Nature 424:805-808 (2003); Chiti et al., Nat Struct Biol 9:137-143 (2002)). Por otro lado, no todos los agregados y fibras comunicados están enriquecidos en estructura β , ya que se ha comunicado que tanto los agregados amorfos como las fibras conservan propiedades espectrales e incluso actividad enzimática similares a las naturales. En estos casos, se ha propuesto que la agregación se produce por otros mecanismos de oligomerización, tales como intercambio de dominios tridimensionales (Rousseau et al., PNAS 98: 5596-5601, 2001; Liu y Eisenberg, Protein Sci 11: 1285-1299, 2002) tal como se observa a menudo en los dímeros de proteínas. El hecho de centrarse en la agregación de proteínas se debe, en gran medida, a la observación de que una serie de enfermedades humanas están caracterizadas por depósitos de proteínas compuestos por uno o un número muy limitado de proteínas.

Algunos ejemplos de dichas enfermedades, donde se sabe que la conversión de proteínas normalmente solubles en proteínas insolubles alteradas conformacionalmente tiene una relevancia causal son, por ejemplo, la aparición de péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer y en la angiopatía amiloide cerebral, depósitos de α -sinucleína en los cuerpos de Lewi de la enfermedad de Parkinson, los priones en la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, superóxido dismutasa en la esclerosis lateral amiotrófica y tau en los ovillos neurofibrilares en la demencia frontal temporal y la enfermedad de Pick. Por tanto, hasta ahora, la agregación de proteínas se ha estudiado principalmente con un fenómeno no deseado causante de enfermedades y en la actualidad se acepta ampliamente que la agregación mediada por beta cruzado es el mecanismo de agregación que se produce con más frecuencia y de mayor relevancia biológica. Aunque desde hace tiempo se considera que la agregación de proteínas es un proceso desordenador mediado por interacciones hidrofóbicas inespecíficas, en la actualidad resulta evidente que en particular, la agregación de amiloide es en muchos casos esencialmente un proceso de auto-asociación específico. Los agregados formados tanto *in vitro* como *in vivo* están generalmente enriquecidos en una proteína particular y aunque la agregación es un proceso espontáneo *in vitro*, en el ambiente celular este proceso está controlado de manera activa por las chaperonas. El mecanismo más común mediante el que se agregan las proteínas mal plegadas consiste en la auto-asociación de segmentos de polipéptido específicos de proteínas idénticas en una lámina beta intermolecular creciente (por ejemplo, Makin et al., PNAS 102(2): 315-20 (2005); Sawaya et al., Nature 447(7143):453-7 (2007)). En general, estos segmentos de agregación-nucleación son cortos, constando de 5-15 restos y pueden predecirse de manera precisa usando algoritmos biofísicos disponibles. En la actualidad hay datos abundantes para demostrar que las hebras individuales interactúan para formar una lámina beta intermolecular y que esta estructura forma el almacén del agregado. Las secuencias agregantes son muy comunes en las proteínas globulares y se producen con una frecuencia aproximadamente igual en proteínas α , β , $\alpha\beta$ y α/β (Clasificación SCOP: Lo Conte et al., Nucleic Acids Res 28:257-259 (2000)) (Linding et al., J Mol Biol 342: 345-353 (2004)). Estas series cortas propensas a la agregación son suficientes para inducir la agregación de una proteína, tal como se ha demostrado mediante experimentos de injerto que demostraron que el trasplante de un segmento de nucleación-agregación de una proteína agregante a una proteína no agregante transfiere tanto la propensión a la agregación como la estructura del agregado de la primera a esta última (Esteras-Chopo et al., PNAS 102: 16672-16677, 2005).

Se puede considerar que las secuencias de proteína sensibles a la agregación son el precio a pagar por la existencia de estructuras de proteína globulares: al producirse las interacciones de cadena lateral terciaria principalmente en el núcleo hidrofóbico, las series de proteína que abarcan esta región normalmente tienen

propensión a la agregación. Sin embargo, para las proteínas globulares naturales, la agregación normalmente no representa un problema, ya que las series de proteína propensas a la agregación quedan normalmente secuestradas por la estructura de la proteína y de este modo, protegidas frente a la auto-asociación. Por otro lado, durante la traducción y el plegamiento de la proteína o en caso de haber estrés celular o mutaciones desestabilizantes, los estados parcialmente plegados tienen muchas más probabilidades de auto-asociarse e inducir agregación y amiloidosis.

Ya que la mayoría de proteínas portan secuencias de péptido propensas a la agregación en su estructura primaria y al ser la agregación específica de la secuencia, se demostró con éxito previamente que es posible desarrollar una estrategia general para inducir de manera específica la agregación de una proteína diana seleccionada (véase el documento WO2007071789). En este último método, se expuso una proteína diana a un portador que presentaba un péptido corto específico de la diana propenso a la agregación (es decir, una región beta-agregante procedente de una proteína diana seleccionada; sorprendentemente, se demostró que la exposición a una región agregante de nucleación tomada de la proteína es una condición suficiente para la agregación). Este portador (nombrado como resto solubilizante, véase, por ejemplo, la figura 1 y su leyenda en el documento WO2007071789) fue esencial para prevenir la agregación y por lo tanto, también la estabilidad de la región β -agregante antes de que esta región se expusiese a la diana.

Sería ventajoso proporcionar moléculas interferidoras adicionales mejoradas que no requieran de un resto portador o solubilizante para permanecer en solución y aun así lograr inhibir la función de proteínas mediante co-agregación. Dichas moléculas serían más fáciles de sintetizar o producir. Además, sería ventajoso definir de manera precisa los determinantes estructurales que permiten que las moléculas, por una parte, permanezcan solubles tal cual, mientras que por otra parte sean capaces de inducir la agregación de una proteína diana. Además, podrían ser muy útiles moléculas que sean capaces de inducir la formación estable de agregado beta intermolecular con una cinética favorable para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas (biotecnología "roja"), así como en aplicaciones de agro-biotecnología (biotecnología "verde"), aplicaciones para organismos marinos y de agua dulce (biotecnología "azul"), industriales (biotecnología "blanca") o para su uso en investigación.

Sumario

La presente invención proporciona moléculas mejoradas (en el presente documento denominadas además moléculas interferidoras) para provocar la agregación de proteínas tras entrar en contacto. Estas moléculas interferidoras dejan de requerir la presencia de un resto solubilizante, a la vez que conservan las propiedades de estabilidad (es decir, prevenir la agregación prematura) y mientras, siguen siendo capaces de provocar la co-agregación con una proteína diana. Por agregación prematura, se entiende que las moléculas se agregan entre sí de tal manera que no pueden lograr la agregación o inhibición de una proteína diana. Sorprendentemente, se ha descubierto que las secuencias inductoras de agregación que están flanqueadas por secuencias o restos con un bajo potencial de formación de lámina beta (es decir, restos que rompen la agregación) no solo son más solubles, sino que a la vez conservan propiedades inductoras de la agregación extremadamente eficaces y además, específicas. Las moléculas descritas en el presente documento pueden tener más de una región inductora de la agregación, que después están flanqueadas cada una por restos que rompen la agregación, más particularmente, las regiones inductoras de la agregación están separadas por un enlazador. En caso de que las proteínas diana sean biológicamente activas o funcionales, la inducción de la agregación dará como resultado normalmente una inhibición funcional de la proteína. Tal como resultará evidente a partir de los ejemplos adjuntos, los interferidores mejorados de la invención tienen aplicaciones terapéuticas y diagnósticas importantes, así como aplicaciones en la agro-biotecnología, la biotecnología blanca y como herramientas de investigación.

Por consiguiente, la presente invención proporciona materia objeto tal como se expone en un cualquiera y en todos de (1) a (32) a continuación:

(1) Un método para inducir la agregación de una proteína que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 restos de aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran en dicha proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de inducir la agregación de dicha proteína;
y en donde el método no se practica en el cuerpo de un ser humano o un animal.

(2) Un método para regular a la baja la función biológica de una proteína que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en dicha proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula se capaz de regular a la baja la función biológica de dicha proteína;
y en donde el método no se practica en el cuerpo de un ser humano o un animal.

(3) Una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil;
para su uso como medicamento.

(4) La molécula de (3), en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante de una enfermedad, para su uso en el tratamiento o prevención de dicha enfermedad.

(5) La molécula de (3), en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil en el cáncer, tal como en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante del cáncer, para su uso en el tratamiento del cáncer.

(6) La molécula de (3), en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil en la AMD, tal como en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante de la AMD, para su uso en el tratamiento de la AMD.

(7) La molécula de (3), en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil en una enfermedad inflamatoria, tal como en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante de una enfermedad inflamatoria, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

(8) Una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;

- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína de un organismo patógeno; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

10 en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica de dicha proteína en el organismo patógeno elimina el organismo patógeno o inhibe el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno;

15 para su uso como compuesto antipatógenos en el tratamiento de una enfermedad infecciosa causada por el organismo patógeno.

(9) Un método para eliminar un organismo patógeno o inhibir el crecimiento y/o la reproducción de un organismo patógeno que comprende poner en contacto el organismo patógeno con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína del organismo patógeno; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

35 en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica de dicha proteína en el organismo patógeno elimina el organismo patógeno o inhibe el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno; y en donde el método no se practica en el cuerpo de un ser humano o un animal.

40 (10) La molécula para su uso de (8) o el método de (9), en donde el patógeno es un organismo vírico.

(11) La molécula para su uso de (8) o el método de (9), en donde el patógeno es un organismo microbiano seleccionado de entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias, hongos, levaduras y mohos.

45 (12) La molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8) o el método de (9), en donde la molécula se proporciona en un dispositivo implantable recubierto al menos parcialmente con la molécula.

50 (13) Un dispositivo implantable recubierto al menos parcialmente con moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína de un organismo patógeno; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

65 en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la

baja de la función biológica de dicha proteína en el organismo patógeno elimina el organismo patógeno o inhibe el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno.

(14) Un método para seleccionar nuevos compuestos inhibidores y/o de detección, que comprende las etapas de:

a) identificar en al menos una proteína al menos una región de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

b) sintetizar una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína identificada en la etapa a); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

c) poner en contacto la molécula preparada en la etapa b) con la proteína de la etapa a); y
d) evaluar la función y/o la agregación de la proteína.

(15) Un método para identificar nuevas dianas para compuestos inhibidores, comprendiendo el método de (14), en donde la proteína en la etapa a) no es una diana conocida para compuestos inhibidores.

(16) Un método para detectar una proteína en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener la proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína que se va a detectar; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función biológica de dicha proteína;

b) detectar la presencia de las moléculas que han reaccionado con la proteína.

(17) El método de (16), en donde el al menos un Y_i que es idéntico a o difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de la serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína que se va a detecta es único para dicha proteína en dicha muestra.

(18) El método de (16) o (17), en donde la molécula comprende un marcador detectable y la detección en la etapa b) es mediante la detección del marcador detectable.

(19) El método de uno cualquiera de (16) a (18), en donde la molécula se proporciona sobre un soporte sólido.

(20) El método de (19), en donde al menos dos moléculas diferentes son capaces de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función biológica de dos proteínas diferentes que se van a detectar se

proporcionan sobre el soporte sólido.

(21) Un método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad que comprende detectar una proteína que es indicativa de la enfermedad en una muestra de un sujeto, en donde la proteína se detecta mediante un método que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener la proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína que se va a detectar; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función biológica de la proteína que se va a detectar;

b) detectar la presencia de las moléculas que han reaccionado con la proteína.

(22) Un método para regular a la baja la función biológica de una proteína en una planta, una célula vegetal o una semilla de planta, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en dicha proteína en dicha planta, célula vegetal o semilla de planta; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula se capaz de regular a la baja la función biológica de dicha proteína.

(23) El método de acuerdo con (22), en donde la molécula es un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos presente en un vector recombinante y que, tras su introducción en la célula vegetal, la semilla de planta o la planta, produce dicho polipéptido en dicha célula vegetal, la semilla de planta o la planta.

(24) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20) o (21)-(23), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8) o (10)-(12) o el dispositivo implantable de (13), en donde dichos X_{2i-1} y X_{2i} son 1 o 2 aminoácidos.

(25) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(24), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24) o el dispositivo implantable de (13) o (24), en donde al menos uno y más particularmente todos, Y_i es una serie de 6 a 13 aminoácidos, particularmente de 6 a 9 aminoácidos, más particularmente de 6 o 7 aminoácidos.

(26) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(25), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(25) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(25), en donde al menos dos y en particular cada uno de, Y_i son cada uno independientemente idénticos a o difieren en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos que se encuentran de manera natural en una proteína.

- 5 (27) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(26), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(26) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(26), en donde cada Z_i se selecciona independientemente de una serie de entre 0 y 20 unidades, en donde una unidad es un aminoácido, un monosacárido, un nucleótido, ácido trioxadecan-succínico (Ttds) o PEG.
- (28) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(26), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(26) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(26), en donde cada Z_i se selecciona independientemente de una serie de entre 0 y 20 unidades, en donde una unidad es un aminoácido.
- 10 (29) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(26), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(26) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(26), en donde cada Z_i se selecciona independientemente de una serie de entre 0 y 10 unidades, en donde una unidad es un aminoácido o PEG.
- 15 (30) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(29), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(29) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(29), en donde n es 1, X_1 y X_2 son en total no más de 5 aminoácidos, Y_1 es una serie de entre 6 y 10 aminoácidos y Z_1 es una serie de 0 unidades.
- 20 (31) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(29), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(29) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(29), en donde n es 2, Z_1 es un enlazador Z_2 es nada.
- 25 (32) El método de uno cualquiera de (1)-(2), (9)-(12), (14)-(20), (21)-(31), la molécula para su uso de uno cualquiera de (3)-(8), (10)-(12) o (24)-(31) o el dispositivo implantable de (13) o (24)-(31), que además comprende un resto que aumenta la solubilidad de la molécula.

La materia objeto proporcionada por la invención pertenece de manera específica a la divulgación, la descripción y la enseñanza de la presente memoria descriptiva.

30 La memoria descriptiva describe moléculas (que incluyen moléculas de acuerdo con los aspectos y realizaciones de la invención) que tienen la siguiente estructura:
 $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- 35 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- 40 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

45 En particular, para las moléculas donde $n=1$, pueden aplicarse limitaciones adicionales. Por ejemplo, un conjunto de limitaciones que está previsto para moléculas donde n es 1, es el siguiente:

- 50 - X_1 y X_2 son 1 o 2 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; y
- Y_1 es una serie de 6 a 11 aminoácidos contiguos,
- 55 - de los cuales, al menos un 75% son aminoácidos hidrofóbicos,
- en la que al menos un 50% de los aminoácidos son restos alifáticos o de F,
- en la que no hay restos de P, R, K, D, E o H presentes,
- en la que no hay más de un resto de C, M, N, Q, W, G, S, A o T presente,
- 60 - en la que no hay más de 3 restos de Y o F presentes,
- en la que no hay más de dos restos no alifáticos idénticos contiguos presentes,
- en la que no hay más de 2 restos alifáticos idénticos contiguos presentes,
- en la que no hay más de dos restos polares no aromáticos consecutivos presentes,
- en donde no hay más de un 50% de restos idénticos presentes,
- 65 - en donde el 1^{er} y/o el último resto es un resto alifático o de F,
- en donde la suma de restos de A y G no es mayor de 2,
- en donde el porcentaje total de restos de A, G y S es de no más del 25%,
- en donde el porcentaje total de restos de C, M, N, Q y W es de no más del 25%,
- y en donde el porcentaje total de restos pequeños distintos de V (es decir, seleccionados de entre A, C, G, S, N, T) es de no más del 25%.

El experto en la materia entenderá que, ya que Z_i es un enlazador entre las unidades de $X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}$ individuales y Z_n es un enlazador opcional en un extremo de la molécula, la fórmula $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$ es equivalente a la fórmula $(Z_i-X_{2i-1}-Y_i-X_{2i})_n$, en donde cada Z_2 a Z_n es un enlazador y Z_1 se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada. En lugar de indicar que Z_n (o el Z_1 N-terminal equivalente) es nada, puede decirse que este resto está ausente - es decir, Z_n es un enlazador o está ausente (o dicho de manera completa: cada Z_i es un enlazador seleccionado independientemente y Z_n (o el Z_1 N-terminal equivalente) es un enlazador o está ausente).

Una fórmula alternativa también podría ser: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i})_n$ - siendo X_{2i-1} y X_{2i} , Y_i i y n como se han definido anteriormente - en donde las n unidades están fusionadas entre sí con enlazadores seleccionados independientemente. Las moléculas pueden comprender en el extremo N y/o C-terminal un enlazador adicional. De acuerdo con esta fórmula, los enlazadores están presentes entre el resto X_{2i} de la unidad i-ésima y el resto X_{2i-1} de la unidad (i+1)-ésima siguiente y hay un total de (n-1) enlazadores en la molécula (es decir, Z_i a Z_{n-1} o Z_2 a Z_n); el último enlazador (Z_n o Z_1 respectivamente) es un enlazador o está ausente. Otra forma más de reformular la fórmula es $Z_0-(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde X_{2i-1} y X_{2i} , Y_i , i y n son como se han definido anteriormente, cada Z_i es un enlazador y tanto Z_0 como Z_n se seleccionan independientemente de entre un enlazador o nada (es decir, las moléculas tienen un enlazador C o N-terminal, ninguno o ambos).

Aunque la molécula consiste normalmente en la estructura descrita anteriormente, también se prevé que las moléculas consisten esencialmente en esa estructura. Por esto se entiende que, de acuerdo con realizaciones particulares, las moléculas pueden contener en N o C-terminal aminoácidos adicionales (es decir, están fusionadas en el extremo N o C-terminal a aminoácidos adicionales), en particular de 1 a 10 aminoácidos, más particularmente, de 1 a 5 aminoácidos. Dichos aminoácidos adicionales se prevén en particular para realizaciones donde n es al menos dos. Los aminoácidos adicionales en particular no tienen un perfil específico, es decir, no son una serie hidrófoba, tal como el o los restos Y_i - en otras palabras, contienen menos de un 50% de restos hidrofóbicos - o simplemente no se seleccionan de entre los restos que forman un resto X numerado. Sin embargo, en algunos casos, en particular donde un resto X no contiene aminoácidos cargados, se prevé que este esté flanqueado adicionalmente por uno o dos aminoácidos hidrofóbicos (en el lado del resto X que no flanquea al resto Y). Este es el caso particularmente donde el resto X (no cargado) y los aminoácidos hidrofóbicos son idénticos a la secuencia de proteína que flanquea la secuencia correspondiente al resto Y_i en la proteína; en otras palabras, donde la parte en la molécula correspondiente en secuencia a la secuencia de proteína comprende al menos un resto X además del resto Y_i . Sin embargo, más particularmente, las moléculas terminan tanto en N como en C-terminal con un resto de X.

Como se ha mencionado, en la fórmula anterior, n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición. En otras palabras, i comienza en 1 y aumenta en 1 con cada repetición hasta que se alcanza n; o i es el número de la repetición (y es un número entero de 1 a n).

Por lo tanto, la fórmula abarca las siguientes estructuras:

$X_1-Y_1-X_2-Z_1$ (es decir, n=1),
 $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2$ (es decir, n=2),
 $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2-X_5-Y_3-X_6-Z_3$ (es decir, n=3),
 $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2-X_5-Y_3-X_6-Z_3-X_7-Y_4-X_8-Z_4$ (es decir, n=4) y
 $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2-X_5-Y_3-X_6-Z_3-X_7-Y_4-X_8-Z_4-X_9-Y_5-X_{10}-Z_5$ (es decir, n=5), en donde cada X, Y y Z numerado es como se ha definido anteriormente.

Cabe destacar que las moléculas son lineales, para asegurar que los restos de Y_i puedan ponerse en contacto con las proteínas que se van a usar como diana. Solo se prevén moléculas ramificadas lineales (donde al menos dos unidades repetitivas $X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}$ están unidas independientemente a través de un enlazador a otra unidad $X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}$) y moléculas cíclicas en la medida que los restos Y_i sean accesibles a otras moléculas.

Los Y_i en la fórmula anterior son secuencias inductoras de la agregación, por lo que se entienden secuencias inductoras de agregación beta. Más particularmente, las secuencias son secuencias de agregación beta no amiloideas (en ocasiones citadas como secuencias de agregación beta amorfas). La agregación beta amiloide y no amiloide difiere en la estructura de orden mayor, en la cinética de agregación y en las secuencias de proteínas adecuadas para agregación (Rousseau et al., Current Opinion in Structural Biology 16:118-126, 2006). De hecho, las preferencias de aminoácidos serán mucho más específicas de la posición en una fibra de amiloide que en los agregados β cruzados amorfos. Por ejemplo, en los hexapéptidos de amiloide, las posiciones 3 y 4 son extremadamente selectivas, ya que solo son compatibles algunos tipos de aminoácidos con una estructura de amiloide altamente ordenada. Por otro lado, las posiciones 1, 2 y 6 son mucho más tolerantes, ya que prácticamente cualquier tipo de resto permite la formación del amiloide (Lopez de la Paz et al., PNAS 101:87-92, 2004). Por el contrario, puede acomodarse prácticamente cualquier resto en cualquier posición de un hexapéptido para que se produzca la agregación β , en tanto que la secuencia en conjunto tenga propensión a encontrarse en una conformación β extendida y es lo suficientemente hidrófoba y/o neutra en cuanto a la carga (Fernandez-Escamilla et al., Nat Biotechnol 22:1302-1306, 2004). Por lo tanto, las posiciones amilogénicas son mucho más específicas en cuanto a la posición, pero también mucho más tolerantes a restos polares y cargados que las secuencias agregantes

β . Esto también tiene consecuencias en la cinética de ambos procesos. Debido a sus requisitos conformacionales menos rigurosos, la β agregación es generalmente mucho más rápida que la amiloidosis. Obsérvese, sin embargo, que hay una fina línea que divide las secuencias compatibles con las estructuras de β amiloide cruzadas altamente ordenadas que forman agregados β cruzados amorfos (Lopez de la Paz et al., PNAS 101:87-92, 2004; Rousseau et al., Current Opinion in Structural Biology 16:118-126, 2006). Aunque en el presente documento se prevé principalmente la agregación amorfa, ya que en algunas situaciones no es deseable la agregación de amiloide (y por lo tanto debe excluirse), para muchas aplicaciones carece de importancia la naturaleza de los agregados. Por lo tanto, también se prevén agregados de amiloide.

Se observó que las secuencias definidas anteriormente tienen una alta tendencia a la agregación beta (esto puede determinarse usando, por ejemplo, algoritmos tales como TANGO, Zyggregator, ...), en particular, una tendencia a la agregación beta no amiloide, en vista de las restricciones en los restos polares y cargados.

Es específico para las moléculas descritas en el presente documento que las secuencias inductoras de la agregación (con un alto potencial de formación de beta-lámina) estén flanqueadas por restos que tienen un bajo potencial formador de beta-lámina o incluso de "romper" las beta-láminas, los denominados restos constitutivos. Estos son los restos X numerados en la fórmula. Sorprendentemente, se observó que las secuencias inductoras de la agregación que están demarcadas por dichos restos específicos, no solo son más solubles que las secuencias que no están flanqueadas por dichos restos constitutivos, sino que a la vez, conservan propiedades inductoras de la agregación muy buenas y específicas. Especialmente, esto último es sorprendente, ya que generalmente se asume que en las proteínas, las secuencias hidrófobas están intercaladas con restos polares o cargados para prevenir la agregación. En las moléculas descritas en el presente documento, los restos constitutivos flanqueantes como sean aseguran que la secuencia inductora de la agregación se presente de manera adecuada a la proteína de interés. Sin quedar ligados a un mecanismo particular, esto puede estar ayudado por interacciones estabilizantes (por ejemplo, enlaces de H o complementariedad de carga) entre los restos constitutivos y la proteína de interés. Esto también puede dar lugar a una especificidad de la interacción aumentada. Obsérvese que la tendencia a la agregación se determina en parte por el ambiente, las propiedades listadas anteriormente se prevén particularmente en condiciones fisiológicas, por ejemplo, a intervalos de pH fisiológicos. Esto no implica que los métodos se limiten a las condiciones fisiológicas, ya que, por ejemplo, la detección de proteínas puede producirse en condiciones no fisiológicas.

Los X_{2i-1} y X_{2i} son series contiguas de 1 a 4 aminoácidos específicos seleccionados de manera independiente: R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q. Aunque pueden usarse todos estos aminoácidos, se obtienen los mejores resultados cuando se usan restos que están raramente o incluso en absoluto presentes en las series Y_i hidrófobas, en particular, restos cargados y/o no hidrofóbicos, en particular, R, K, E, D, P, N, S, H, Q y G (obsérvese que aunque normalmente se considera G como un resto hidrofóbico, la ausencia de cadenas laterales y su diminuto tamaño significa que no favorece particularmente la agregación de beta lámina), más particularmente, R, K, E, D, P y H (es decir, restos cargados, incluyendo H o prolina), aún más particularmente, R, K, E, D y P (es decir, restos cargados o prolina, que debido a su cadena lateral particular induce un doblaje y es un buen péptido rompedor), lo más particularmente, R, K y P (restos positivos o prolina) o R y P (resto positivo no hidrofóbico o prolina). Como alternativa, R, D y P se prevén como restos constitutivos: R es un resto más voluminoso y no hidrofóbico que K (hidrofóbico) y por lo tanto, es mucho más rompedor para la formación de beta-lámina. Aunque D es más pequeño, su carga es más próxima a la cadena principal del péptido o proteína y más difícil de negar. De acuerdo con realizaciones muy particulares, más particularmente cuando n es 1, no se prevé que K sea un resto constitutivo - por lo tanto, los aminoácidos del resto X se seleccionan de entre R, E, D, P, N, S, A, H, G y Q o un subconjunto de los mismos.

Tal como se explicará con más detalle, para las realizaciones donde $n=1$, pueden aplicarse limitaciones adicionales a las moléculas. Esto no se debe a que estas moléculas sean no funcionales, sino porque la técnica anterior puede haber descrito moléculas de naturaleza peptídica (con un fin distinto) que tienen la misma estructura general a la descrita en el presente documento. Las limitaciones son en particular en cuanto a la longitud, a la naturaleza de los restos previstos en restos específicos, tal como se describe en la descripción detallada. Aunque estas limitaciones más estrictas se necesitarán únicamente para moléculas donde $n=1$, también se prevén para $n=2$ (o un n incluso mayor).

De acuerdo con realizaciones particulares, cada X_{2i-1} y X_{2i} tiene 1 o 2 aminoácidos. Los restos adicionales a los de la secuencia agregante desempeñan un papel secundario a la hora de mantener la molécula en solución. De acuerdo con realizaciones alternativas, pero no excluyentes, cada X_{2i-1} y X_{2i} tiene una carga total de no más de 2. Como alternativa, el número total de aminoácidos en ambos restos X es de 5 o menor, particularmente de 4 o menor. Algunas realizaciones alternativas prevén que la carga total de ambos restos X que rodean a la región Y hidrófoba sea menor de 5, particularmente de 4 o menor. Las realizaciones en este párrafo se prevén más particularmente para moléculas donde n es 1 o moléculas donde n es dos.

El Y_i tal como se ha descrito en la fórmula en el presente documento, es una secuencia agregante beta. Más particularmente, es una serie seleccionada independientemente de 4 a 17, en particular de 4 a 16 o de 4 a 15 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y

preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T. En particular, está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E en la secuencia. Sin embargo, de acuerdo con realizaciones muy particulares, pueden estar presentes dos restos seleccionados de entre R, K; D y E, en tanto que la carga neta sea cero (es decir, si sus cargas son opuestas). Ya que se prevé más K que R en una serie hidrófoba, pueden estar presentes dos restos seleccionados de entre K; D y E en el resto Y_i . Ya que en estas realizaciones es necesario que la carga sea cero, esto equivale a decir que están presentes dos restos cargados, uno de los cuales es un resto de K y el otro se selecciona de entre un resto de D y E. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, o bien no hay restos de P, R, K, D o E en el resto Y_i o hay dos restos cargados presentes que tienen una carga complementaria (de tal forma que la carga neta es cero).

La longitud de la secuencia agregante estará normalmente influenciada por la especificidad deseada, la facilidad de síntesis y la secuencia de la proteína de interés. La presente memoria descriptiva describe que al menos uno y en particular todos los Y_i pueden ser una serie de 4 a 17 aminoácidos, de 4 a 16 aminoácidos, de 4 a 15 aminoácidos, de 4 a 14 aminoácidos, de 4 a 13 aminoácidos, particularmente de 4 a 11 aminoácidos, de 4 a 10 aminoácidos, de 4 a 9 aminoácidos o de 4 a 8 aminoácidos. La presente memoria descriptiva describe que la longitud de la serie Y_i puede ser de al menos 5 aminoácidos. Por consiguiente, al menos uno y particularmente todos los Y_i pueden ser una serie de 5 a 13 aminoácidos, particularmente de 5 a 11 aminoácidos, de 5 a 10 aminoácidos, de 5 a 9 aminoácidos o de 5 a 8 aminoácidos. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, la longitud de la serie Y_i es de al menos 6 aminoácidos. Por consiguiente, al menos uno y particularmente todos los Y_i son una serie de 6 a 13 aminoácidos, particularmente de 6 a 11 aminoácidos, de 6 a 10 aminoácidos, de 6 a 9 aminoácidos o de 6 a 8 aminoácidos. Más particularmente, al menos uno y particularmente todos los Y_i son series de 6 o 7 aminoácidos. Se prevén particularmente dichas series más cortas que de 16 aminoácidos en realizaciones donde n es 1.

Obsérvese que son posibles series más largas de 16 aminoácidos (por ejemplo, hasta 20 aminoácidos), pero apenas aportan especificidad de cara a una proteína de interés (véase la figura 2) mientras que aumentan la dificultad y el coste de la síntesis, así como reducen la solubilidad de las moléculas. Otro motivo por el que se prevén particularmente en el presente documento moléculas donde n es 1 o 2 es su facilidad de síntesis y manipulación. Sin embargo, para estrategias transgénicas o cuando las moléculas se producen de manera recombinante, la longitud apenas es un factor limitante (del coste) y en particular en estas estrategias, también se prevé que funcione con moléculas más largas.

Un objetivo es proporcionar moléculas que sean capaces de regular a la baja de manera específica a proteínas, en particular, de una manera específica de secuencia. La presente memoria descriptiva describe que al menos uno de los Y_i en la molécula es una serie de 4 a 16 aminoácidos o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, una serie de 6 a 16 aminoácidos, que es idéntica a una serie contigua de origen natural en una proteína. De acuerdo con aspectos específicos adicionales, esta es la causa para más de un Y_i en la molécula, en particular, para dos Y_i o al menos dos Y_i en la molécula, lo más particularmente, para todos los Y_i en la molécula. Las diferentes longitudes previstas también se aplican a esta realización.

Esto se basa en la sorprendente observación de que la beta agregación no amiloide es específica de secuencia. De hecho, generalmente se aceptó que ya que, a diferencia de la agregación de amiloide, puede acomodarse prácticamente cualquier resto en cualquier posición para que se produzca la agregación β , en tanto que la secuencia en conjunto tenga propensión a encontrarse en una conformación β extendida y es lo suficientemente hidrófoba y/o neutra en cuanto a la carga, la agregación beta no fue específica de secuencia, sino que dependió de interacciones hidrófobas y de enlace de H. Sorprendentemente, la tendencia a la agregación para una secuencia dada es mucho mayor con una serie de secuencia idéntica que con otra secuencia hidrófoba, hasta el punto que puede usarse para la agregación específica (inhibición y/o detección) de proteínas en mezclas complejas.

La presente memoria descriptiva describe que la al menos una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, de origen natural en una proteína es única para dicha proteína en el organismo (o especie) en cuyo genoma se codifica la proteína. En otras palabras, la secuencia corresponde o es idéntica a solo una secuencia de proteína distinta en el proteoma de dicho organismo/especie. El resultado es que, en caso de que se administre dicha molécula a un organismo de dicha especie, solo se regulará a la baja esa proteína.

De acuerdo con realizaciones alternativas, la secuencia no es necesariamente única para la proteína, sino que es única para el organismo o especie. Esto puede preverse cuando las moléculas descritas en el presente documento se administren a más de una especie diferente de manera simultánea (por ejemplo, una mezcla de microorganismos), mientras que solo se necesita regular a la baja una especie de proteína (por ejemplo, para una especie patógena diana, mientras que no se interfiere con organismos beneficiosos). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la secuencia es única para la proteína y única para el organismo/especie.

En lugar de especie, las consideraciones anteriores también se aplican a un género, una familia, un orden o una clase de organismos, aunque la probabilidad de conservación de secuencia y de hallar una secuencia única, se reduce a medida que aumenta la clasificación taxonómica.

La presente memoria descriptiva describe que la al menos una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos o de acuerdo

- con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, de origen natural en una proteína está presente en más de una proteína del organismo o especie en cuyo genoma se codifica dicha proteína. Es decir, la secuencia corresponde o es idéntica a más de una secuencia de proteína distinta en el proteoma de dicho organismo/especie. Esto permite que se regule a la baja más de una proteína. Otra alternativa
- 5 más (no excluyente) es que la serie de secuencia esté presente en una proteína de más de un organismo/especie. Por lo tanto, la secuencia corresponde o es idéntica a al menos una secuencia de proteína diferente en el proteoma de al menos dos organismos/especies diferentes. Esto permite la regulación a la baja de una proteína en más de un organismo. Esto puede ser útil para la reactividad cruzada (por ejemplo, para permitir el uso de una molécula en
- 10 sujetos de especies diferentes). Sin embargo, también se prevé de manera particular la regulación a la bajasmultánea de proteínas en organismos (en particular, infecciosos) mientras que se administra solo una molécula a un sujeto. Evidentemente, también se prevén combinaciones de ambos, es decir, la serie está presente en más de una proteína y en más de un organismo/especie. Asimismo, en este caso, la especie puede reemplazarse por un género, familia, orden o clase de organismos.
- 15 Cabe destacar que el uso como diana de más de una proteína o de más de un organismo/especie también puede lograrse usando moléculas con al menos dos regiones Y_i , en donde al menos una de las regiones Y_i corresponde a una serie en al menos dos proteínas diferentes y/o a una serie en al menos dos organismos/especies/etc. diferentes. Las al menos dos regiones Y_i pueden ser (cada una independientemente) únicas para una proteína u organismo o pueden aparecer en más de una proteína u organismo.
- 20 Típicamente, la serie Y_i que es idéntica a una serie de origen natural en una proteína será completamente idéntica a la de la proteína. Sin embargo, en algunos casos, se prevé que puedan usarse secuencias no idénticas, pero estrechamente relacionadas, es decir, secuencias que tienen una o dos sustituciones. A fin de mantener la especificidad, se prevé que para las sustituciones no conservativas, para las series Y_i de menos de 6 aminoácidos, solo se tolere una diferencia de aminoácidos. Para secuencias de al menos 6 aminoácidos (en particular, al menos 7 o al menos 8 aminoácidos), pueden sustituirse uno o dos aminoácidos. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe que al menos una Y_i difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie en una
- 25 proteína de origen natural si la longitud de esa Y_i es menor de 6 aminoácidos o al menos una Y_i difiere en una o dos sustituciones de aminoácidos respecto de una serie en una proteína de origen natural si la longitud de esa Y_i es de al menos 6 aminoácidos. De acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, al menos una Y_i es una serie idéntica a o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que aparece en una proteína de interés. En dichos casos, las sustituciones son normalmente en comparación con la serie presente en la proteína de interés (es decir, la serie Y_i es idéntica a la serie presente en la proteína de interés salvo por una sustitución de aminoácidos (o dos). Tal como será evidente para un experto en la materia, la realización de una sustitución (en particular, no conservativa) puede dar como resultado una especificidad alterada (es decir, hacer idéntica la serie a una de otra proteína en el organismo), por lo que debe comprobarse si esto sucede en caso de que no se desee un direccionamiento alterado. (En algunos casos, puede ser deseable dirigirse de manera específica a más de una proteína, véase también más adelante). Para asegurarse de que la sustitución no da como resultado una pérdida de especificidad demasiado elevada, la sustitución preferentemente se efectúa
- 30 únicamente en una o dos de las regiones Y_i . De acuerdo con realizaciones específicas, en caso de que esté presente una región Y_i con un aminoácido sustituido, hay presente al menos una región Y_i diferente en donde no se han producido sustituciones.
- 35 De acuerdo con realizaciones particulares, la sustitución es con un resto constitutivo, en particular, con uno seleccionado de entre R, K, E, D, P, N, S, A, H, G, Q, más particularmente seleccionado de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre restos de R, K y P.
- 45 De acuerdo con realizaciones alternativas, la sustitución es una sustitución conservativa. Esto se prevé cuando se prevé regular a la baja una familia de proteínas y las proteínas comparten un motivo de secuencia conservado, pero no idéntico. En dichos casos, puede lograrse la agregación de estas proteínas estrechamente relacionadas usando un motivo de secuencia consenso (es decir, una secuencia similar pero ni idéntica, donde "similar" se usa en el contexto del alineamiento de secuencias). Sin embargo, es posible que la agregación sea menos eficaz cuando la coincidencia de secuencias no sea del 100%.
- 50 De acuerdo con otras realizaciones alternativas adicionales, la sustitución es sustitución de un resto con una propensión a formar beta láminas relativamente baja por un resto con una mayor propensión a formar beta láminas; para potenciar la agregación. Típicamente, puede reemplazarse un resto con una puntuación $P(b\text{-lámina})$ de Chou-Fasman menor de 100 por un resto con una puntuación $P(b\text{-lámina}) > 100$.
- 55 Cabe destacar que, la sustitución es siempre con el mismo número de restos, las eliminaciones o inserciones anularán la beta-agregación específica.
- 60 De acuerdo con realizaciones específicas, n es mayor de uno (es decir, de dos a cinco), lo que significa que hay más de una región Y_i presente en la molécula (al menos dos y hasta cinco). Para una proteína diana, solo es necesario que esté presente en la molécula una región Y_i idéntica a una serie en esa proteína. Además, las regiones Y_i pueden ser, por ejemplo, secuencias inductoras de la beta-agregación sintéticas. Sin embargo, normalmente, la presente
- 65

memoria descriptiva describe que para detectar o regular a la baja proteínas, cuando n es mayor de uno, al menos dos y particularmente cada uno de las Y_i son una serie de 4 a 16 o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos de origen natural en una proteína. (De manera independiente, para cada serie, se aplican las consideraciones anteriores). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, las al menos dos Y_i aparecen en la misma proteína. Esto aumenta la probabilidad de provocar la agregación de la proteína. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, dichas al menos dos Y_i son parcialmente solapantes. Este puede ser el caso cuando la proteína de interés tiene una serie larga que cumple los criterios para la región Y_i de la molécula. En este caso, una Y_i de la molécula puede corresponder a una parte de la serie en la proteína, mientras que otra Y_i corresponde a otra parte parcialmente solapante de la misma serie. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales, las al menos dos Y_i son idénticas. Por lo tanto, cuando dos regiones Y_i corresponden a series en la misma proteína, pueden ser iguales o diferentes.

En realizaciones alternativas, sin embargo, se prevé que puedan usarse al menos dos Y_i para lograr el direccionamiento a más de una proteína. Por lo tanto, en estas realizaciones, las al menos dos Y_i proceden de (al menos dos) proteínas diferentes, es decir, a lo largo de su longitud, la secuencia de las al menos dos Y_i corresponde o es idéntica a al menos dos secuencias de proteína diferentes. El número de proteínas puede ser tan alto como el número de regiones Y_i , pero obviamente, también es posible usar, por ejemplo, 4 regiones Y_i para dirigirse de manera específica a dos proteínas diferentes.

De manera similar, de acuerdo con realizaciones alternativas, pueden usarse las al menos dos Y_i para lograr el direccionamiento a más de un organismo/especie. Por lo tanto, en estas realizaciones, las al menos dos Y_i proceden de (al menos dos) organismos/especies diferentes, es decir, la secuencia de las al menos dos Y_i corresponde o es idéntica a al menos una secuencia de proteína diferente en el proteoma de al menos dos organismos/especies diferentes. Asimismo, en este caso, la especie puede reemplazarse por un género, familia, orden o clase de organismos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las secuencias β agregantes son menos tolerantes a la presencia de restos polares y cargados de manera particular que las secuencias amilogénicas. Por consiguiente, en realizaciones específicas, la carga total de al menos una Y_i , en particular de al menos dos Y_i , más particularmente de cada Y_i no es mayor de 1. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, el número de restos cargados en al menos una Y_i , en particular de al menos dos Y_i , más particularmente de cada Y_i no es mayor de 1. Sin embargo, más particularmente, el número de restos cargados o de prolinas en un resto Y_i es cero.

Tal como se ha indicado en la fórmula anterior, las moléculas descritas en el presente documento también contienen restos enlazadores, Z_i . De acuerdo con realizaciones particulares, las moléculas solo contienen enlazadores internos y ningún enlazador N o C-terminal. Por lo tanto, en realizaciones específicas, Z_n es nada (o es un enlazador de cero unidades enlazadoras).

La naturaleza de los restos enlazadores no es vital para la invención, aunque preferentemente no se usan enlazadores flexibles. De acuerdo con realizaciones particulares, cada Z_i se selecciona independientemente de entre una serie de de entre 0 y 20 unidades idénticas o no idénticas, en donde una unidad es un aminoácido, un monosacárido, un nucleótido o un monómero. Las unidades no idénticas pueden ser unidades no idénticas de la misma naturaleza (por ejemplo, aminoácidos diferentes o algunos copolímeros). También pueden ser unidades no idénticas de una naturaleza diferente, por ejemplo, un enlazador con unidades de aminoácidos y nucleótidos o un heteropolímero (copolímero) que comprende dos o más especies monoméricas diferentes. De acuerdo con realizaciones particulares, la longitud de al menos uno y particularmente cada uno de Z_i distinto de Z_n , es de al menos 1 unidad. De acuerdo con otras realizaciones particulares, Z_n es 0 unidades. De acuerdo con realizaciones particulares, todos los enlazadores Z_i distintos de Z_n son idénticos. De acuerdo con realizaciones adicionales, todos los restos Z_i son idénticos.

De acuerdo con realizaciones específicas, al menos uno y particularmente todos los Z_i tienen entre 0 y 10 unidades de la misma naturaleza, en particular, entre 0 y 5 unidades de la misma naturaleza. De acuerdo con realizaciones particulares, al menos un resto Z_i y en particular, todos los restos Z_i a excepción de Z_n , es un enlazador peptídico o polipeptídico. Algunas secuencias particularmente previstas de dichos enlazadores incluyen, pero sin limitación, PPP, PP o GS. El enlazador también puede ser de naturaleza química. Algunos enlazadores particularmente previstos incluyen PEG y Ttds (también conocido como ácido 4,7,10-trioxadecan-13-succinámico).

Típicamente, no se usan enlazadores largos. Sin embargo, de acuerdo con las realizaciones particulares donde los restos Y_i corresponden a regiones inductoras de la agregación de más de una proteína, se prevé que puedan usarse enlazadores largos. De hecho, para asegurarse de que la molécula pueda interactuar (por ejemplo, simultáneamente) con más de una proteína, puede ser beneficioso aumentar la distancia entre los diferentes restos Y_i de direccionamiento, de tal forma que no se previene la interacción causada por impedancia estérica. En estos casos, el enlazador Z_i puede ser una serie de entre 0 y 100 unidades idénticas o no idénticas, en donde una unidad es un aminoácido, un monosacárido, un nucleótido o un monómero; o de entre 0 y 90, 0 y 80, 0 y 70, 0 y 60, 0 y 50, 0 y 40, 0 y 30 o 0 y 20. En particular, la longitud mínima del enlazador Z_i es de al menos 1 unidad, al menos 2 unidades, al menos 3 unidades, al menos 4 unidades o al menos 5 unidades.

En el caso de que los restos Y_i sean idénticos a regiones agregantes de dos proteínas diferentes, las moléculas se denominan biespecíficas (para tres proteínas, trispecíficas, y así sucesivamente).

5 De acuerdo con realizaciones específicas, la longitud total de las moléculas descritas en el presente documento no supera los 60, 55 o 50 aminoácidos. Más particularmente, la longitud no supera los 40 aminoácidos, 30 aminoácidos, 25 aminoácidos o 20 aminoácidos.

10 Las moléculas particularmente previstas son aquellas donde $n=1$ o $n=2$, por ejemplo, aquellas con la siguiente estructura: $X_1-Y_1-X_2-Z_1$ (es decir, n es 1), en donde X_1 y X_2 tienen en total no más de 5 aminoácidos; Y_1 es una serie de entre 4 y 10 aminoácidos y Z_1 es una serie de 0 unidades; y $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2$ (es decir, n es 2), en donde Z_1 es un enlazador y Z_2 es nada.

15 La molécula puede comprender además (o puede estar además fusionada a) otros restos. Se prevé particularmente que la molécula comprende además un marcador detectable. El marcador detectable puede encontrarse en N o C-terminal o incluso puede estar fusionado a la molécula (por ejemplo, a través del enlazador o el enlazador puede usarse como marcador detectable). Como alternativa, el marcador detectable puede referirse al uso de uno o más aminoácidos marcados en uno o más de los restos $X-Y-Z$ de la molécula (por ejemplo, aminoácidos marcados fluorescente o radiactivamente).

20 Ya que los restos Y_i idénticos a una región en una proteína pueden dirigirse de manera específica a la proteína (a condición de que la secuencia sea única para la proteína en el organismo en cuyo genoma se codifica dicha proteína), otro resto que puede unirse a las moléculas es una molécula pequeña o un fármaco, de tal forma que esta molécula pequeña o fármaco puede dirigirse a la proteína, compartimento celular, tipo celular, etc. correcto donde es necesario que se suministre. En estos casos, al menos una de las regiones Y_i será idéntica a una secuencia de una proteína que está presente, donde es necesario suministrar el fármaco o la molécula pequeña.

25 Otro resto que puede unirse a la molécula es un resto que aumenta la solubilidad de la molécula. Dichos restos se conocen bien en la técnica y algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, PEG (polietilenglicol) o derivados de PEG, un péptido, una proteína o un dominio de proteína. La naturaleza del resto dependerá de la aplicación, tal como puede determinarse por la persona experta.

30 Obsérvese que, para realizaciones donde está presente Z_n , el marcador detectable (u otro resto, tal como un marcador de solubilización) puede fusionarse al resto enlazador Z_n . (Aunque esta notación implicaría que el marcador se añade al extremo C-terminal, también se prevén marcadores N-terminales - esto corresponde a la notación equivalente de $(Z_i-X_{2i-1}-Y_i-X_{2i})_n$, en donde cada Z_2 a Z_n es un enlazador y Z_1 es el enlazador al que se fusiona el marcador).

35 En estos casos donde se fusionan otros restos a las moléculas, se prevé en realizaciones particulares que estos restos pueden eliminarse de la molécula. Típicamente, esto se efectuará incorporando un sitio de escisión de proteasas específico o una estrategia equivalente. El sitio de escisión puede incorporarse por separado o puede ser una parte integral del enlazador Z_n externo (o un enlazador Z_1 externo en caso de que el resto sea N-terminal). De acuerdo con realizaciones muy específicas, el resto puede formar parte de un enlazador Z_i interno o puede ser incluso el enlazador Z_i completo.

40 En muchas aplicaciones típicas, las moléculas interferidoras descritas en el presente documento pueden usarse o añadirse tal cual. Sin embargo, de acuerdo con un aspecto muy particular, se prevé que estas moléculas se proporcionen en forma de ácidos nucleicos que codifican las moléculas. Huelga decir que las moléculas interferidoras de acuerdo con estas realizaciones son de naturaleza completamente polipeptídica, ya que es necesario que puedan codificarse. Es decir, todos los restos X, Y y Z presentes en las moléculas interferidoras son de naturaleza polipeptídica.

45 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también describe una molécula de ácido nucleico que codifica (o cuya secuencia codifica) una molécula que tiene la estructura descrita anteriormente, en particular, la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- 50 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- 60 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- 65 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Se prevé particularmente que las secuencias de ácido nucleico codifiquen las moléculas con todas las limitaciones y variaciones descritas en el presente documento, *mutatis mutandis*. Por lo tanto, el polipéptido codificado es esencialmente como se ha descrito en el presente documento, es decir, las variaciones mencionadas para las moléculas interferidoras que sean compatibles con este aspecto también se prevén como variaciones para los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico. A modo de ejemplo, las realizaciones que especifican la secuencia o la longitud de los restos X o Y son compatibles con estar codificadas en ácidos nucleicos, las realizaciones en donde el resto Z es de naturaleza no aminoacídica no lo son.

De acuerdo con realizaciones específicas, la secuencia de polipéptido codificada es un polipéptido de origen no natural. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la molécula de ácido nucleico es un gen artificial. Ya que el aspecto del ácido nucleico es particularmente adecuado en aplicaciones que emplean expresión transgénica, las realizaciones particularmente previstas son aquellas donde la molécula de ácido nucleico (o el gen artificial) se fusiona a otro resto, en particular, a ácidos nucleicos adicionales que codifican un resto que aumenta la solubilidad y/o la estabilidad del producto génico. De hecho, en ocasiones, la expresión transgénica de péptidos puede ser difícil, debido a la rápida degradación del producto.

La presente memoria descriptiva también describe vectores recombinantes que comprenden dicha molécula de ácido nucleico que codifica (o con una secuencia que codifica) una molécula como se ha descrito en el presente documento. Estos vectores recombinantes son idealmente adecuados como vehículos para portar la secuencia de ácido nucleico de interés al interior de una célula donde se expresa la proteína que se vaya a regular a la baja y dirigir la expresión del ácido nucleico en dicha célula. El vector recombinante puede permanecer en forma de una entidad separada en la célula (por ejemplo, en forma de un plásmido o un portador vírico o no vírico) o puede integrarse en el genoma de la célula.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también describe células que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica (o con una secuencia que codifica) una molécula como se ha descrito en el presente documento o que comprenden un vector recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica dicha molécula interferidora. La célula puede ser una célula procariota o eucariota. En este último caso, puede ser una célula de levadura, alga, vegetal o animal (por ejemplo, una célula de insecto, mamífero o humana). La célula puede proporcionarse en forma de una línea celular.

Sin embargo, la célula también puede formar parte de un organismo (o ser, por ejemplo, una célula madre). Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también describe organismos transgénicos no humanos que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica (o con una secuencia que codifica) una molécula como se ha descrito en el presente documento o que comprenden un vector recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica dicha molécula interferidora. El organismo puede ser cualquier organismo (incluyendo un microorganismo). Se prevé particularmente que el organismo transgénico sea un organismo mamífero no humano. De acuerdo con otras realizaciones alternativas más, la estrategia transgénica se usa en animales no humanos, por ejemplo, para la validación de la diana en modelos animales de enfermedad. Esto puede ser en mamíferos (por ejemplo, ratones transgénicos) u otros vertebrados o incluso en animales invertebrados, por ejemplo, nematodos (tales como *C. elegans*) o moscas de la fruta (tales como *D. melanogaster*).

De acuerdo con realizaciones particulares alternativas, la estrategia transgénica (es decir, proporcionar las moléculas interferidoras codificadas en ácido nucleico en lugar de directamente en forma de polipéptidos) es particularmente adecuada para su uso en plantas. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también describe plantas o células vegetales o semilla de plantas que contienen una molécula de ácido nucleico, un gen artificial o un vector recombinante como se ha descrito en el presente documento. O las células u organismos transgénicos proporcionados en el presente documento son plantas, células vegetales o semillas de plantas.

De acuerdo con un aspecto adicional, las moléculas descritas en el presente documento pueden usarse para regular a la baja o inhibir la función de una proteína. Típicamente, esto se logra induciendo la agregación de dicha proteína. La presente memoria descriptiva describe métodos para regular a la baja la función de una proteína que comprenden poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

En particular, para las moléculas donde n es 1, podrían aplicarse limitaciones adicionales. Por ejemplo, X_1 y X_2 pueden ser cada uno 1 o 2 aminoácidos en lugar de 1 a 4. X_1 y X_2 también pueden seleccionarse de entre P, R, K, D, E. La longitud del resto Y_1 puede adaptarse.

No es necesario que ninguna de estas limitaciones den como resultado la regulación a la baja de moléculas, pero describen realizaciones que funcionan particularmente bien. Una limitación particular que también se prevé para métodos para regular a la baja la proteína donde n es 1, es que Y_1 es una serie de 4 a 11 aminoácidos contiguos. Otra limitación particular (que, al igual que la mayoría de limitaciones en el presente documento, puede combinarse) es que Z_1 no sea un enlazador de aminoácidos. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, Z_1 es nada (es decir, un enlazador de 0 unidades).

Para las moléculas, se aplican las mismas consideraciones y limitaciones anteriores. En particular, cabe destacar que, en tanto que se logre la regulación a la baja de la función, pueden tolerarse una o dos sustituciones en la Y_i que se produce en la proteína, tal como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, estos métodos se proporcionan para regular a la baja una proteína en una situación de enfermedad o para efectuar un diagnóstico. La memoria descriptiva describe una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n (o i aumenta de 1 a n con cada repetición);
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 15 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

para su uso como medicamento o en diagnósticos.

Asimismo, en este caso, se prevé particularmente que si n es 1, Y_1 es una serie de 4 a 11 aminoácidos contiguos. Además, si n es 1, se prevé particularmente que Z_1 no sea un enlazador de aminoácidos. De acuerdo con realizaciones adicionales, Z_1 es nada.

Tal como se usa en el presente documento, los métodos y usos son a menudo intercambiables, es decir, una molécula para su uso como medicamento o más particularmente, una molécula para su uso en el tratamiento de una enfermedad específica equivale a un método para tratar la enfermedad que comprende el uso de (por ejemplo, la puesta en contacto con) la molécula, es equivalente al uso de las moléculas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, las reivindicaciones de "segundo uso médico", las reivindicaciones de "método de tratamiento" y las denominadas reivindicaciones de "estilo suizo" se usan de manera indistinta en el presente documento y cuando se lista una de estas, también se infieren las otras.

Ya que las moléculas se proporcionan para su uso como medicamento o en diagnósticos o en métodos de tratamiento o de diagnóstico, también se prevé que puedan proporcionarse en forma de agentes farmacéuticos. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas descritas en el presente documento. En particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos una molécula que tiene la siguiente estructura:

$(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 15 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Más particularmente, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- 5 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 15 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; en donde al menos una Y_i es una serie de 4 a 15 aminoácidos contiguos de origen natural en una proteína; y
- 10 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Más particularmente, en las composiciones farmacéuticas, al menos una Y_i de las moléculas está presente en una proteína que se vaya a regular a la baja en el sujeto al que se administrará la composición. Obsérvese que esto no implica que esta proteína esté codificada en el genoma de dicho sujeto. De hecho, para sujetos que padecen una infección, se prevé que se administren moléculas que se dirijan específicamente a proteínas del organismo infeccioso y no del sujeto en sí.

20 De acuerdo con realizaciones particulares, la molécula puede proporcionarse en forma liofilizada con un tampón fisiológico. De acuerdo con realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas, en caso de ser líquidas, se proporcionan a pH fisiológico, en particular entre pH 5 y 9, más en particular entre pH 6 y pH 8.

25 En realizaciones específicas, las moléculas pueden usarse para regular a la baja una proteína (una o más) que necesita ser regulada a la baja en una situación de enfermedad.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$ para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, en donde:

- 30 - n es 1 a 5 e i va de 1 a n (o i aumenta de 1 a n con cada repetición);
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- 35 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con la enfermedad; y
- 40 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

45 Tal como se ha mencionado anteriormente, las moléculas descritas para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad es equivalente a decir que se describen métodos para tratar o prevenir enfermedades en un sujeto que lo necesite, que comprenden: administrar al sujeto una molécula que tiene la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n (o i aumenta de 1 a n con cada repetición);
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- 50 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con la enfermedad; y
- 55 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

60 Otra forma equivalente de exponer esto es que se proporcionan usos de moléculas que tienen esta estructura para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

El sujeto es, en particular, un animal, más particularmente un mamífero (por ejemplo, gato, perro, conejo, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, llama, ratón, rata, mono, otro primate, etc.), más en particular, un ser humano.

65 Las enfermedades particularmente previstas incluyen, pero sin limitación, cáncer, degeneración macular asociada a la edad (AMD) e inflamación. Por lo tanto, las moléculas pueden proporcionarse para el tratamiento de estas

enfermedades (o se proporcionan métodos para tratar estas enfermedades; o usos de moléculas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de estas enfermedades), en donde al menos una Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión está asociada con el cáncer, la AMD o la inflamación/una enfermedad inflamatoria, respectivamente.

- 5 Más particularmente, la proteína que se va a regular a la baja en el cáncer es VEGFR-2 o EGFR. También más particularmente, la proteína que se va a regular a la baja en la AMD es VEGFR-2. Las proteínas más particularmente previstas para su regulación a la baja en las enfermedades inflamatorias incluyen TNF- α e IL-1 β .

10 De acuerdo con un aspecto adicional, las moléculas se usan como medicamento en enfermedades infecciosas. Es decir, se usan para regular a la baja la función de proteínas en organismos que causan infecciones en un sujeto, siendo dichos organismos virus, bacterias, hongos o macroparásitos, tales como garrapatas, ácaros, nematodos, platelmintos, etc. La presente memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 15 - n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 20 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo patógeno;
 y
 25 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

para su uso como un compuesto contra patógenos.

30 Esto equivale a decir que se describen métodos para prevenir o tratar una infección patógena en un sujeto que lo necesite, que comprenden:
 administrar al sujeto una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 35 - n es 1 a 5 e i va de 1 a n ;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 40 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo patógeno;
 y
 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

45 Otra forma equivalente de exponer esto es que se proporcionan usos de moléculas que tienen esta estructura para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por un organismo patógeno.

50 De acuerdo con realizaciones muy específicas, la región Y_i puede contener exactamente 2 restos cargados (seleccionados de entre R, K, D, E), en tanto que la carga neta de la región Y_i sea cero. Sin embargo, más particularmente, la región Y_i no contiene ningún resto cargado (o para esa materia, prolina).

Los patógenos pueden ser organismos víricos. Por consiguiente, la memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 55 - n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 60 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo vírico; y
 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

65 para su uso como antivírico.

Esto equivale a decir que se describen métodos para prevenir o tratar una infección vírica en un sujeto que lo necesite, que comprenden:

administrar al sujeto una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 5
- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 - 10 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo vírico; y
 - 15 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Otra forma equivalente de exponer esto es que se proporcionan usos de moléculas que tienen esta estructura para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por un organismo vírico.

20 En particular, las moléculas se usan como agentes antimicrobianos. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n (o i aumenta de 1 a n con cada repetición);
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 25 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo microbiano; y
- 30 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

35 para su uso como antimicrobiano.

Esto equivale a decir que se describen métodos para prevenir o tratar una infección microbiana en un sujeto que lo necesite, que comprenden:

administrar al sujeto una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 40
- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 - 45 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo microbiano; y
 - 50 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Otra forma equivalente de exponer esto es que se proporcionan usos de moléculas que tienen esta estructura para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por un organismo microbiano.

55 Algunas etapas adicionales de estos métodos pueden incluir la evaluación (o la medición) de la presencia del organismo patógeno, vírico o microbiano.

60 De acuerdo con realizaciones particulares donde el patógeno es un organismo microbiano, la proteína de un organismo microbiano es una proteína de un organismo microbiano seleccionado de entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias, protozoos, arqueas, hongos (tales como levaduras y mohos). Más particularmente, es una proteína de bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias y hongos.

65 De acuerdo con realizaciones particulares, el organismo patógeno es un organismo, cepa o variante resistente a fármacos. Por lo tanto, la proteína del organismo patógeno es una proteína de un organismo, cepa o variante resistente a fármacos. La administración de moléculas dirigidas a estos organismos seguirá teniendo efecto en estos

organismos, tal como se muestra en la sección de ejemplos.

Un ejemplo particular de resistencia a fármacos es la resistencia a los antibióticos. De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína de un organismo microbiano es una proteína de un organismo, cepa o variante resistente a los antibióticos. La administración de moléculas dirigidas a estos organismos seguirá teniendo efecto en estos organismos, tal como se muestra en la sección de ejemplos. Más particularmente, se proporcionan métodos de administración, en donde se administran las moléculas como se describen en el presente documento al menos una vez al día durante al menos diez días. En particular, este régimen de tratamiento no va acompañado del desarrollo de resistencia a antibióticos. Por lo tanto, estas realizaciones prevén que los valores de CIM a lo largo de este intervalo en el tiempo no aumentan más de cuatro veces o no se duplican. Más particularmente, se prevé que, durante una administración prolongada, el valor de CIM de la molécula interferidora para el organismo microbiano específico permanezca por debajo del punto de corte clínico de la molécula interferidora para el organismo microbiano específico.

De acuerdo con realizaciones específicas, las moléculas pueden usarse para eliminar el organismo patógeno (por ejemplo, microbiano) o los métodos dan como resultado la eliminación del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano). De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, las moléculas tienen éxito en eliminar rápidamente el organismo patógeno (por ejemplo, microbiano), en particular, en una hora o menos o en 30 minutos o menos. De acuerdo con realizaciones alternativas, los métodos que usan las moléculas inhiben el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano) sin eliminarlo. En este contexto, los virus también se consideran organismos "vivos", por ejemplo, una reducción en la carga vírica es indicativa de la eliminación del organismo vírico, mientras que una estabilización de la carga vírica es indicativa de la inhibición de la reproducción.

De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína del organismo patógeno/vírico/microbiano es una proteína esencial, es decir, el organismo no puede sobrevivir si está desprovisto de la proteína. De acuerdo con otras realizaciones particulares (no excluyentes), la proteína del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano) está implicada en la formación de biofilms. De acuerdo con realizaciones adicionales, se proporcionan métodos para tratar o prevenir la formación de biofilms, en donde la proteína del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano) está implicada en la formación de biofilms. De acuerdo con otras realizaciones adicionales, la formación del biofilm es sobre un objeto, en particular, un dispositivo implantable, tal como un catéter o un estent.

Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también describe métodos para prevenir, inhibir o revertir el crecimiento de biofilms microbianos sobre una superficie, que comprenden poner en contacto la superficie con una molécula de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; en donde al menos una Y_i es una serie presente en una proteína de un organismo microbiano; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Más particularmente, la proteína del organismo microbiano es una proteína implicada en la formación de biofilms. La superficie sobre la que se previene, inhibe o revierte la formación del biofilm puede ser una superficie biótica o abiótica. Las superficies particularmente previstas son aquellas de dispositivos implantables, tales como catéteres o estents.

En referencia a las superficies abióticas, también se prevén dentro del alcance de la invención dispositivos recubiertos con las moléculas descritas en el presente documento. El recubrimiento de los dispositivos puede efectuarse directamente, aplicando las moléculas al dispositivo. Como alternativa, pueden recubrirse sobre el dispositivo usando enlazadores (reticulantes). Los dispositivos pueden estar completamente recubiertos (por ejemplo, mediante inmersión del dispositivo en una solución de las molécula) o pueden recubrirse solo partes del dispositivo. Se prevé particularmente que los dispositivos estén recubiertos con moléculas contra una proteína presente en un organismo microbiano, en particular, una proteína implicada en la formación de biofilms.

Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe dispositivos implantables recubiertos al menos parcialmente con moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;

- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

De acuerdo con un aspecto adicional, se proporcionan métodos para seleccionar nuevos compuestos. Estos compuestos son las moléculas descritas en el presente documento y pueden usarse como compuestos inhibidores o compuestos de detección. La presente memoria descriptiva describe métodos de selección que comprenden las etapas de:

a) identificar en al menos una proteína al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

b) sintetizar una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína identificada en la etapa a); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

c) poner en contacto la molécula preparada en la etapa b) con la proteína de la etapa a); y

d) evaluar la función y/o la agregación de la proteína.

Estos métodos tienen ventajas particulares: pueden usarse para una selección no sesgada, ya que puede usarse cualquier proteína del proteoma de un organismo. Como alternativa, pueden usarse para una selección selectiva, por ejemplo, para hallar nuevas dianas (es decir, proteínas que aún no se usan como diana por compuestos inhibidores). De acuerdo con estas realizaciones, la proteína en la etapa a) no es una diana conocida para compuestos inhibidores.

La puesta en contacto de la molécula y la proteína en la etapa c) puede ser totalmente *in vitro*, por ejemplo, con proteína purificada en un tubo de ensayo o una placa. Sin embargo, los métodos también pueden usarse en sistemas celulares: las moléculas preparadas en la etapa b) pueden ponerse en contacto, por ejemplo, con la proteína, añadiendo las moléculas a una línea celular. El modo mediante el cual se pondrán en contacto las moléculas con la proteína depende del organismo o la célula en la que está presente la célula, y esto determinará la disponibilidad de la proteína en condiciones naturales o *in vitro*.

La función puede evaluarse, por ejemplo, usando lecturas indicadoras adecuadas. En caso de que la selección sea para compuestos de detección en lugar de compuestos inhibidores, la detección de la presencia o agregación de los compuestos será normalmente la lectura, en lugar de una funcional. Sin embargo, se prevé que pueda usarse el mismo compuesto tanto para la inhibición como para la detección (véase, por ejemplo, el ejemplo 4).

Estos métodos también pueden usarse para seleccionar compuestos mejorados (en lugar de solo seleccionar los nuevos). Por ejemplo, cuando se conoce un compuesto inhibidor, pueden seleccionarse variaciones de este compuesto, por ejemplo, variando los restos usados para los restos X, probando diferentes enlazadores, acortando o alargando el resto Y_i y similares.

Para una selección de compuestos anti-patógenos (es decir, en donde la proteína en la etapa a) es una proteína de un organismo patógeno), se prevé particularmente que la puesta en contacto pueda efectuarse añadiendo o administrando la molécula al organismo patógeno, especialmente para microorganismos patógenos. También se prevé particularmente que, en caso de que la al menos una proteína sea una proteína de un organismo patógeno, la evaluación de la función y/o agregación de la proteína en la etapa d) puede efectuarse evaluando la supervivencia, la reproducción y/o el crecimiento del organismo patógeno.

Asimismo, en este caso, la al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una región de 6 a 16 aminoácidos contiguos, identificada en la etapa a) puede producirse en más de una proteína de un organismo patógeno. Esto probablemente aumentará las

probabilidades de éxito, ya que de este modo se usa más de una proteína como diana.

Asimismo, la al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una región de 6 a 16 aminoácidos contiguos, identificada en la etapa a) puede producirse en al menos una proteína de más de un organismo patógeno. Esto permite el uso como diana de más de un organismo

5 patógeno con el mismo compuesto, de manera similar, por ejemplo, a los antibióticos de amplio espectro.

La memoria descriptiva describe métodos para seleccionar nuevos compuestos antimicrobianos. Estos métodos comprenden las etapas de:

10 a) identificar en al menos una proteína microbiana al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

15 b) sintetizar al menos una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n (o i aumenta de 1 a n con cada repetición);
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos
- 20 seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en
- 25 una proteína de un organismo microbiano identificado en la etapa a); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

30 c) añadir la al menos una molécula preparada en la etapa b) al organismo microbiano en cuyo genoma se codifica la proteína de la etapa a); y

d) evaluar la supervivencia y/o el crecimiento o la reproducción del organismo microbiano.

Al evaluar la supervivencia, pueden determinarse los valores de CIM. Para identificar un compuesto con actividad antimicrobiana, es decir, para clasificar una molécula como un acierto, la CIM debe ser en particular menor de 100

35 $\mu\text{g/ml}$.

En las realizaciones que abarcan métodos para identificar nuevas dianas para compuestos antimicrobianos, se prevé particularmente que la proteína microbiana en la etapa a) no sea una diana conocida para antibióticos. Esto hará que los compuestos identificados sean particularmente útiles en terapia combinada, ya que se abordan diferentes dianas.

40

Otra ventaja particular es que los métodos de selección pueden llevarse a cabo sin sesgo de selección para una proteína particular como diana de interés. De hecho, puede analizarse el proteoma completo del organismo microbiano y pueden usarse las secuencias adecuadas en moléculas descritas en el presente documento y comprobarse su eficacia. Esto tiene altas probabilidades de proporcionar nuevas dianas. Además, cuando se efectúa dicho análisis, se prevé que las regiones identificadas en la etapa a) sean regiones que aparecen más de una vez en el proteoma. Más particularmente, la al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una región de 6 a 16 aminoácidos contiguos, identificada en la etapa a) aparece en más de una proteína del organismo microbiano.

50

Ya que, en muchos casos, es deseable usar como diana más de un organismo microbiano (por ejemplo, antimicrobianos de amplio espectro), también se puede asegurar que la al menos una región de 4 a 15 aminoácido contiguos o, de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una región de 6 a 16 aminoácidos contiguos, identificada en la etapa a) se produce en una proteína o en al menos una proteína, de más de un organismo microbiano.

55

Más particularmente, los organismos microbianos usados como diana en el presente documento son organismos microbianos patógenos. Para asegurarse de que no se eliminan organismos microbianos beneficiosos (por ejemplo, microorganismos beneficiosos en la flora intestinal de un sujeto), puede comprobarse si la serie identificada en el organismo microbiano es específica para organismos patógenos y no aparece en microorganismos beneficiosos.

60

De acuerdo con un aspecto adicional, la molécula se usa en detección o como agente de diagnóstico. Por consiguiente, se proporcionan métodos de detección y de diagnóstico. La presente memoria descriptiva describe métodos para detectar una proteína en una muestra, que comprende las etapas de:

65

- a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener la proteína con una (es decir, al menos una) molécula

de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n (o i aumenta de 1 a n con cada repetición);
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en la proteína que se vaya a detectar; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

b) detectar la presencia de moléculas que han reaccionado con la proteína.

La muestra puede proporcionarse tal cual o puede procesarse previamente. La detección puede ser directa o indirecta (es decir, se detecta la fracción que ha reaccionado o la que no ha reaccionado) y puede efectuarse mediante detección de las moléculas (por ejemplo, moléculas marcadas) o de la proteína (por ejemplo, detección de la fracción que no ha reaccionado). La naturaleza del método de detección no es vital para la invención, puede usarse cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia (por ejemplo, basado en anticuerpos, basado en masa, basado en adsorción, ...).

De acuerdo con realizaciones particulares, la al menos una Y_i de origen natural en la proteína que se va a detectar es única para dicha proteína en dicha muestra. Por lo tanto, por ejemplo, en una muestra de origen humano, la secuencia que también aparece en la proteína que se va a detectar está codificada solo una vez en el genoma humano (o se produce solo una vez en el proteoma humano), a saber, en la (secuencia que codifica la) proteína que se va a detectar. Aunque esta unicidad no es siempre necesaria - por ejemplo, cuando proteínas diferentes tienen una secuencia agregante idéntica y se detectan juntas, siguen pudiéndose discriminar adicionalmente, por ejemplo, basándose en el tamaño - se prevé particularmente que facilita la detección. La parte "en dicha muestra" es importante para determinar la unicidad de la serie de proteína: por ejemplo, en caso de que se procese previamente la muestra, es probable que contenga menos proteínas diferentes que la detección en mezclas complejas o en muestras de diferentes (micro)organismos.

De acuerdo con realizaciones muy específicas, la región Y_i puede contener exactamente 2 restos cargados (seleccionados de entre R, K, D, E), en tanto que la carga neta de la región Y_i sea cero. Sin embargo, más particularmente, la región Y_i no contiene ningún resto cargado (o para esa materia, prolina).

Cabe destacar que los presentes métodos de detección son altamente similares a los métodos establecidos, normalmente métodos de detección a base de anticuerpos. La diferencia significativa es el uso de las moléculas particulares. De hecho, cabe destacar que en los métodos de detección descritos en el presente documento, las moléculas, tal como se han definido en el presente documento, cumplen un papel similar al de los anticuerpos. Por lo tanto, en los métodos de detección que normalmente están basados en anticuerpos, las moléculas descritas en el presente documento pueden reemplazar a al menos un anticuerpo. Por ejemplo, las moléculas donde al menos una Y_i es una serie de origen natural en la proteína que se va a detectar pueden reemplazar a un anticuerpo primario en ensayos de detección (y pueden marcarse como "interferidores primarios"), las moléculas donde Y_i es una serie de origen natural en un anticuerpo primario usado para la detección pueden reemplazar a un anticuerpo secundario. Como alternativa, la molécula interferidora secundaria puede dirigirse a una etiqueta o marcador condensado a un anticuerpo primario o puede dirigirse a un "interferidor primario" o a un resto condensado al mismo. Al igual que con los anticuerpos, un "interferidor primario" también puede servir como anticuerpo de captura, donde el resto de la detección se produce con anticuerpos (o por ejemplo, con otro interferidor primario y con anticuerpo). Esta configuración se cita normalmente como un ensayo en sándwich.

De acuerdo con realizaciones específicas, la molécula usada para la detección comprende un marcador detectable. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, la detección en la etapa b) es mediante la detección del marcador detectable.

De acuerdo con realizaciones particulares, los métodos comprenden adicionalmente una separación de moléculas que han reaccionado con la proteína y moléculas que no han reaccionado con la proteína antes de la detección en la etapa b). Como alternativa, los métodos pueden comprender una separación de la proteína que ha reaccionado con las moléculas y la proteína que no ha reaccionado con las moléculas antes de la detección en la etapa b).

La detección en la etapa b) puede ser directa o indirecta, por ejemplo, mediante detección de la fracción de moléculas que no ha reaccionado. La detección puede ser cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa.

De acuerdo con realizaciones particulares, la muestra es de un sujeto, en particular, de un sujeto animal o vegetal,

más particularmente, de un sujeto mamífero, lo más particularmente, de un sujeto humano.

Sin embargo, puede usarse cualquier muestra que contenga proteínas y de acuerdo con realizaciones particulares, la muestra no es de un organismo. Este es el caso, particularmente, para aplicaciones en biotecnología blanca, donde, por ejemplo, el análisis se efectúa respecto de la pureza de los productos o para la detección de proteínas en alimentos y piensos o para detectar proteínas contaminantes en el agua y similares.

Aunque la detección de la proteína puede ser la última etapa del método, normalmente puede ir seguida de una etapa posterior de correlacionar la presencia (o ausencia o cantidad) de la proteína detectada con un estado particular. Por ejemplo, en las aplicaciones de biotecnología blanca mencionadas, la presencia de la proteína puede proporcionar una indicación de la contaminación o de la pureza. Por ejemplo, en muestras de material vegetal, la cantidad de una proteína detectada puede indicar qué línea produce más cantidad de un producto concreto, información que puede usarse, por ejemplo, para seleccionar plantas para su fitomejoramiento posterior.

De acuerdo con realizaciones específicas, la presencia, ausencia o cantidad de proteína detectada es indicativa de un estado de enfermedad. Dicho estado de enfermedad puede ser, por ejemplo, la presencia de enfermedad, la ausencia de enfermedad, la progresión de la enfermedad (por ejemplo, neoplasia maligna, metástasis, respuesta a la terapia farmacológica, recidiva). Algunos ejemplos de proteínas asociadas con estados de enfermedad, por ejemplo, biomarcadores, se encuentran bien documentados en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de dichas proteínas incluyen CRP (normalmente usada para monitorizar la inflamación) y PSA (usado en la detección temprana de cáncer de próstata), así como IL-1 β y TNF- α , que también son marcadores de la inflamación. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, estos métodos comprenden adicionalmente una etapa c) que correlaciona la presencia, ausencia o cantidad de proteína detectada en la muestra con un estado de enfermedad en un sujeto. Como también se observa a partir de estos marcadores, son enfermedades cuyo diagnóstico se prevé de manera particular el cáncer y las enfermedades inflamatorias.

La presente memoria descriptiva también describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína que es indicativa de un estado de enfermedad; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

para su uso en el diagnóstico de dicho estado de enfermedad.

Asimismo, en este caso, el cáncer y las enfermedades inflamatorias son dos tipos de enfermedades que se prevén particularmente (o de manera similar, se proporciona el uso de las moléculas para la fabricación de un diagnóstico para enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades inflamatorias)).

Ya que en el presente documento se prevén, por ejemplo, diagnósticos *in vitro*, también se proporcionan kits que comprenden al menos una molécula como se ha descrito en el presente documento (incluyendo una molécula de ácido nucleico que codifica dicha molécula o un vector recombinante como se ha descrito en el presente documento) y al menos un tampón adecuado.

La presente memoria descriptiva también describe, como una forma especial de kit, soportes sólidos que contienen al menos dos moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

De acuerdo con realizaciones particulares, las moléculas se unen al soporte sólido mediante un enlazador. Las al menos dos moléculas serán normalmente al menos dos moléculas diferentes. Algunos ejemplos de soportes sólidos

particulares incluyen, pero sin limitación, micromatrices, placas precubiertas, nanopartículas y dispositivos de laboratorio sobre un chip. Ya que muchos de estos dispositivos se usan para detectar más de una proteína (a menudo hasta decenas o cientos de proteínas a la vez), se prevé que se proporcionen soportes sólidos que comprendan al menos 5 moléculas, al menos 10 moléculas, al menos 20 moléculas, al menos 50 moléculas, al menos 100 moléculas, al menos 200 moléculas, al menos 500 moléculas o al menos 1000 moléculas.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, las moléculas se usan para regular a la baja las funciones de proteínas en plantas, células vegetales o semillas de plantas. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe métodos para regular a la baja la función biológica de una proteína en una planta o célula vegetal o semilla de planta, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína en dicha planta, célula vegetal o semilla de planta; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Más particularmente, la molécula es un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos presente en un vector recombinante y que, tras su introducción en la célula vegetal, la semilla de planta o la planta, produce dicho polipéptido en dicha célula vegetal, la semilla de planta o la planta.

De acuerdo con realizaciones muy específicas, la región Y_i puede contener exactamente 2 restos cargados (seleccionados de entre R, K, D, E), en tanto que la carga neta de la región Y_i sea cero. Sin embargo, más particularmente, la región Y_i no contiene ningún resto cargado (o para esa materia, prolina).

La memoria descriptiva también describe composiciones agroquímicas. Estas composiciones comprenden al menos una molécula con la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

y un vehículo agrónomicamente aceptable.

Para composiciones agroquímicas, la al menos una Y_i será particularmente una serie de origen natural en una proteína en o sobre una planta, célula vegetal o semilla de planta. Estas pueden ser proteínas de una planta (típicamente la planta sobre o junto a la que se aplica la composición agroquímica) o proteínas de plagas de plantas que pueden aparecer sobre las plantas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de Venn que agrupa aminoácidos según sus propiedades. Adaptado de Livingstone y Barton, CABIOS, 9, 745-756, 1993.

Figura 2: Porcentaje de secuencias únicas para una longitud de péptido dada en el proteoma de diferentes organismos. Para generar la figura, se tomó la secuencia genómica de un organismo, se generaron todos los péptidos de una longitud X codificados en el genoma, después se contó con qué frecuencia se producía cada péptido y se representó la fracción que es única (es decir, secuencias únicas frente a todas las secuencias de esta longitud).

Figura 3: Cuantificación de biofilms maduros de cepas que expresan la construcción agregadora Als3 en condiciones inductoras y represoras. Los biofilms maduros se cultivaron sobre discos cuadrados de silicona durante 48 h en succinato (barras blancas) o en YNB, D-glucosa al 4% (barras negras). Como control, se usó *C. albicans* SC5314. Las cepas recombinantes que expresaban los interferidores Als3p mostraron una capacidad

formadora de biofilms significativamente reducida cuando se indujeron, en comparación con el control ($*p < 0,001$). La cuantificación se efectuó mediante recuento de UFC y los datos se representan como el porcentaje de las células viables comparado con el control (100%). Se calcularon las desviaciones estándar a partir de dos experimentos diferentes.

5 **Figura 4:** Las construcciones interferidoras de *Candida albicans* demostraron una adhesión (panel A) y una invasión (panel B) reducidas respecto de la línea celular epitelial TR-146.

10 **Figura 5:** El péptido candidato F9 da como resultado una fuerte inhibición de la formación de biofilms. Formación de biofilms por *Candida albicans* SC5314 en una placa de poliestireno de 96 pocillos en presencia de diferentes concentraciones (250 μ M, 50 μ M y 10 μ M) de péptido E1 (RNGIVIVATTR (SEQ ID NO: 7)), péptido E2 (RLQQYTLIIYLSVATAK (SEQ ID NO: 8)) y péptido F9 (RKLLFNLGSRNGIVIVATTR (SEQ ID NO: (9))). (A) Los péptidos se añadieron únicamente durante la fase de adhesión de *Candida* y el desarrollo de un biofilm maduro continuó en RPMI1640-MOPS fresco, mientras que en (B), los péptidos estuvieron presentes durante el desarrollo completo del biofilm, incluyendo el periodo de adhesión. Los biofilms se cuantificaron mediante un ensayo de reducción de XTT. El control (100%) contenía únicamente medio fresco con la concentración final de DMSO al 1%. La presencia de péptido E1 y F9, dio como resultado una reducción significativa en la formación de biofilms ($*p < 0,001$). Los datos representan el porcentaje de la actividad metabólica de las células de *Candida* tratadas con péptido en comparación con el control (100%). Se calcularon las desviaciones estándar a partir de tres experimentos diferentes. Cada concentración del péptido se ensayó por triplicado.

15 **Figura 6:** El péptido F9 redujo la adhesión de *Candida albicans* SC5314 y la formación de biofilm sobre poliestireno. (A) Adhesión de *C. albicans* SC5314 en placas de poliestireno de 96 pocillos en presencia de péptido F9 (50 μ M, 10 μ M y 2,5 μ M). Se llevó a cabo el ensayo de reducción de XTT después de 90 min de adhesión a 37 °C. (B) Formación de biofilm maduro *in vitro* de células de *Candida* pretratadas con diferentes concentraciones de péptido durante el periodo de adhesión. El desarrollo de biofilm adicional (48 h) continuó en RPMI1640-MOPS. La muestra de control se trató con DMSO al 1% (100%). Se usó *C. albicans als3 Δ als3 Δ* como control. El péptido F9 redujo significativamente la adhesión y el desarrollo adicional de biofilm maduro ($*p < 0,001$). Los datos representan el porcentaje de la actividad metabólica de las células de *Candida* tratadas con péptido, después de la adhesión (90 min) o de 48 h de formación de biofilm, en comparación con el control (100%). Se calcularon las desviaciones estándar a partir de cinco experimentos diferentes. Cada concentración del péptido se ensayó por triplicado.

20 **Figura 7:** Las células de *Candida albicans* SC5314 tratadas con péptido vieron reducida su capacidad para formar biofilms sobre catéteres de poliuretano *in vivo*. Se incubaron células de *C. albicans* SC5314 en presencia de péptido F9 (50 μ M) durante el periodo de adhesión (90 min) a 37 °C. Posteriormente, se lavaron los catéteres y se implantaron por vía subcutánea. Los biofilms se formaron durante 6 días. Se usó *C. albicans als1 Δ als1 Δ als3 Δ als3 Δ* como control. *C. albicans als3 Δ als3 Δ* formaron biofilms de manera similar al tipo silvestre. El tratamiento de células de *Candida* durante el periodo de adhesión con el péptido F9 dio como resultado una menor formación de biofilm maduro *in vivo* ($*p < 0,001$). Los datos se presentan como la media de Log₁₀ de UFC obtenidas por dispositivo. En total, se estudiaron 20 dispositivos. En cada experimento, se usaron dos animales por cada cepa o condición.

25 **Figura 8:** El péptido F9 redujo la capacidad de *Candida albicans* SC5314 para adherirse a catéteres de poliuretano. Se trataron células de *C. albicans* SC5314 con péptido F9 (50 μ M) durante el periodo de adhesión (90 min a 37 °C). Se lavaron los dispositivos y se llevó a cabo la cuantificación de células de *Candida* adheridas mediante recuento de las UFC. *C. albicans als3 Δ als3 Δ* y *C. albicans als1 Δ als1 Δ als3 Δ als3 Δ* se adhirieron significativamente menos en comparación con el control ($*p < 0,001$). Las células de *Candida* de tipo silvestre tratadas con péptido F9 demostraron propiedades de adhesión reducidas en comparación con las células no tratadas ($*p < 0,001$). Los datos se presentan como la media de Log₁₀ de UFC obtenidas por dispositivo después del periodo de adhesión. En total, se usaron 9 catéteres por cepa o condición ensayada.

30 **Figura 9:** El péptido F9 reduce la capacidad de *Candida albicans* SC5314 para adherirse y para invadir células epiteliales. Se administraron tres concentraciones de péptido F9 diferentes (50 μ M, 10 μ M y 2,5 μ M) durante la adhesión de *C. albicans* SC5314 (1 h) (A) y la invasión (3 h) (B) a la línea celular epitelial TR-146. Las partes adherentes e invasoras de células fúngicas en las células epiteliales se tiñeron con blanco de calcoflúor y se contratiñeron con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Los cubreobjetos se observaron mediante epifluorescencia. Se calculó el porcentaje de células adheridas como la media de células de *Candida* unidas sobre cien áreas dispersas a lo largo de toda la superficie del cubreobjetos. Se redujeron significativamente la adherencia y las capacidades invasoras de *C. albicans als3 Δ als3 Δ* ($*p < 0,001$). Se determinó el porcentaje de células de *C. albicans* invasoras dividiendo el número de células internalizadas entre el número total de células adherentes. Se contaron al menos 100 células fúngicas sobre cada portaobjetos. Se calcularon las desviaciones estándar a partir de tres experimentos diferentes y cada concentración del péptido se ensayó por duplicado.

35 **Figura 10:** El tipo silvestre, el mutante de eliminación homocigoto y el transformante de *Cnb1* tienen un fenotipo similar en las condiciones inductoras/represoras del promotor normales. Cuando se induce estrés añadiendo SDS (0,01%) al medio, el transformante muestra un fenotipo que es similar al tipo silvestre en condiciones represoras del promotor (medio SD), mientras que el fenotipo en condiciones inductoras del promotor (medio SCAA) muestra una mayor semejanza con el mutante de eliminación homocigoto. Los datos mostrados son representativos para las 4 construcciones.

40 **Figura 11:** La cinética de eliminación para *S. epidermidis* y *S. aureus*, tratadas con diferentes moléculas interferidoras, a su concentración inhibidora mínima (CIM) y 2xCIM.

45 **Figura 12:** Monitorización del desarrollo de resistencia en *S. aureus* ATCC.

Figura 13: Estudios de desarrollo de resistencia a largo plazo en MRSA. La línea roja y la flecha representan una reducción de factor 2 en la resistencia para C30 debido a la privación de péptido del medio durante 1 día.

Figura 14: Propiedades hemolíticas de los péptidos interferidores.

Figura 15: Curva de resistencia para *S.aureus* cultivadas a sub-CIM durante 15 días.

5 **Figura 16:** Liberación de lactato deshidrogenasa de células de riñón embrionario humano a diferentes concentraciones de los péptidos interferidores C30 y Hit50.

Figura 17: Porcentaje de recuperación de la línea celular de riñón embrionario humano después de un periodo de incubación de 24 horas en presencia de dos péptidos interferidores antibacterianos (compuesto30 y Hit50). La figura muestra una recuperación del 90 por ciento de células HEK tratadas con 100 µg/ml de Hit50. La inhibición del crecimiento se debe a la presencia de DMSO como tampón en lugar de deberse al péptido interferidor (el tampón usado para la solubilización del péptido interferidor fue DMSO al 50% en agua ultrapura).

10 **Figura 18:** Medición de la intensidad de fluorescencia verde de células tratadas con diversos péptidos interferidores con el tiempo. La lisostafina (línea superior en la figura) representa en este caso el control lítico, ya que se sabe que rompe la pared celular estafilocócica muy rápidamente y da lugar a una rápida liberación del contenido celular. La línea inferior en la figura representa el tampón.

15 **Figura 19:** Medición de la intensidad de fluorescencia verde (verde Sytox) de células tratadas con diversas concentraciones de péptido interferidor C30.

Figura 20: Potencial de membrana (gráfica de puntos de fluorescencia roja/verde de DiOC₂) de bacterias no tratadas (A), tratadas con DMSO (B), despolarizadas con control de CCCP (C), tratadas con lisostafina (G), tratadas con C30 (25 µg/ml) medida en los puntos de tiempo de 0 (D), 5 (E) y 15 (F) minutos.

20 **Figura 21:** Unión del colorante diagnóstico de amiloide, tioflavina T, a *S. aureus* tratadas con diferentes concentraciones de compuesto C30. Obsérvese que el péptido interferidor C30 solubilizado en el medio también proporciona cierta fluorescencia de fondo.

25 **Figura 22:** Unión del colorante diagnóstico de amiloide, rojo Congo, a células bacterianas tratadas con concentraciones crecientes del compuesto C30.

Figura 23: Micrografías SEM de *Bacillus cereus* no tratadas (panel izquierdo) y tratadas con compuesto C30 a 3xCIM durante 5 minutos (panel derecho, parte superior) o durante 20 minutos (panel derecho, parte inferior). Se produce una evidente reducción de la pared celular de las células tratadas, con una aparente liberación del contenido. Además, las células parecen más cortas, lo que indica una división celular alterada. No hay poros visibles, ni cráteres presentes en la superficie celular.

30 **Figura 24:** Micrografías SEM de *Staphylococcus aureus* ATCC no tratadas (A) y tratadas con C30 (B). Existe una evidente diferencia en una serie de células que contiene septos de división, lo que sugiere una división alterada en células tratadas con C30. Después de una hora de tratamiento, algunas células bacterianas comienzan a perder su contenido.

35 **Figura 25:** Micrografías electrónicas de transmisión de *Staphylococcus aureus* tratadas con C30 (panel derecho) y tratadas con DMSO (panel izquierdo), fijadas después de 20 minutos de tratamiento. Las células son redondas y están intactas, con una membrana celular bien definida. Pueden observarse algunas estructuras similares a mesosoma en la población de células tratadas (flecha que apunta).

40 **Figura 26:** Micrografía TEM de estafilococos tratados con C30 durante 20 minutos a 4xCIM. El contenido citoplasmático comienza a reducirse, aunque no puede observarse una lisis celular evidente. La región de ADN tiene una densidad a los electrones muy alta, lo que sugiere condensación del ADN, que es un signo de etapa tardía de la apoptosis.

45 **Figura 27:** Micrografías electrónicas de transmisión de secciones ultrafinas marcadas inmunológicamente de *Staphylococcus aureus* expuestas a C30 marcado con FITC (dos filas superiores, imágenes A a F) y secciones inmunomarcadas, no expuestas a péptido (fila inferior, imágenes no marcadas). Las flechas rojas muestran agregados de péptido. Los septos de las células tratadas con péptido muestran una forma irregular y la división celular es asimétrica. Los péptidos son captados por la célula y los agregados residen en el citoplasma.

50 **Figura 28:** El péptido Hit1 (secuencia: RWVSMLLRRGSRWVSMLLRR (SEQ ID NO: 31)) y Hit57A (secuencia: RFFIGLSRRGSRRIQAYLYRR (SEQ ID NO: 78)) redujeron eficazmente el número de bacterias en monocapas celulares infectadas. Todos los compuestos se usaron a 100 µg/ml.

Figura 29: Transferencias sondadas con péptido anti-CipC.

Figura 30: Intensidad de señal de estreptavidina-HRP de puntos que contienen diferentes concentraciones de péptidos.

55 **Figura 31:** Eficacias en vancomicina frente al compuesto C30 suministrado por vía intravenosa e intraperitoneal contra *Staphylococcus aureus* MRSA 326 en el modelo de muslo de ratón neutropénico.

Figura 32: Curvas de crecimiento de virus en múltiples etapas en células tratadas con interferidores antivíricos a 10 µM (paneles A, B) o 1 µM (paneles C, D), Tamiflu o PBS. Hdí, horas después de la infección.

60 **Figura 33:** Actividad relativa de luciferasa después de la transfección de todos o de un subconjunto de componentes de minirreplíción. "Mx1": además de todos los componentes de minirreplíción, también se transfectó un vector de expresión para Mx1.

Figura 34: Actividad relativa de luciferasa en presencia de interferidores dirigidos contra diferentes proteínas víricas. R-GS, R-PP, D-PP, R-PS indican la naturaleza del resto constitutivo (antes del guion) y el enlazador interno (después del guion) usado.

65 **Figura 35:** Actividad relativa de luciferasa en presencia de interferidores dirigidos contra diferentes proteínas víricas internas (M1 y NS1) que no están implicadas en el ensayo de minirreplíción. Valor de control = 1. R-PP, D-PP, R-PS indican la naturaleza del resto constitutivo (antes del guion) y el enlazador interno (después del guion)

usado.

Figura 36: Descripción general esquemática de la tecnología de detección mediante interferidores específicos.

Figura 37: Análisis de transferencia de Western y de PepBlot de β -Gal de lisados celulares completos bacterianos BL21. El carril 1 muestra la detección con anticuerpo anti- β -Gal policlonal de conejo; El carril 2 muestra la detección con el péptido interferidor, Tango 1 (*b*-RLAWLQR (SEQ ID NO: 79)); El carril 3 muestra la detección con el péptido interferidor, Tango 2 (*b*-RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 80)); y el carril 4 muestra la interacción con el interferidor de péptido fuera de la diana (*b*-RPITVNPPFR (SEQ ID NO: 81)). Las membranas se expusieron con sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 100 s. La flecha superior muestra la posición predicha de la proteína β -Gal en la transferencia. La flecha inferior representa el producto de unión específico, que probablemente es SRP libre.

Figura 38: Análisis PepBlot de la especificidad de unión del péptido Tango 2 de ts y mutante a β -Gal de lisados celulares completos BL21: Carril 1 - péptido de ts (*b*-RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 80)); Carril 2 - péptido mut_1 (*b*-RVPIWSLGNR (SEQ ID NO: 82)); Carril 3 - péptido mut_2 (*b*-RVIPWSLGNR (SEQ ID NO: 83)); y Carril 4 - péptido mut_3 (*b*-RVIPESLGNR (SEQ ID NO: 84)). Las membranas se expusieron con sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 100 s. La flecha indica la posición de β -Gal sobre las tiras de membrana.

Figura 39: Análisis PepBlot de la cinética de unión del péptido Tango 2 (*b*-RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 80)) a β -Gal de lisados celulares completos BL21. Las proteínas separadas en la membrana se expusieron al péptido interferidor Tango 2 en el tampón de unión durante diferentes puntos de tiempo: Carril 1 - Sin exposición al péptido; Carril 2 - 30 s; Carril 3 - 5 min; Carril 4 - 10 min; Carril 5 - 15 min; Carril 6 - 30 min; Carril 7 - 45 min; y Carril 8 - 60 min de incubación. Las membranas se expusieron con sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 100 s. La flecha indica la posición de β -Gal sobre las tiras de membrana.

Figura 40: Análisis de diferentes niveles de proteína β -Gal añadidas en lisados celulares completos BL21 no inducidos. La detección se logró usando (A) PepBlot con péptido interferidor Tango 2 (*b*-RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 80)) y (B) WB con anticuerpo anti- β -Gal policlonal de conejo. Carril 1 - Sin β -Gal; Carril 2 - 11,6 ng de β -Gal; Carril 3 - 58 ng de β -Gal; Carril 4 - 116 ng de β -Gal; Carril 5 - 290 ng de β -Gal; Carril 6 - 580 ng de β -Gal; Carril 7 - 870 ng de β -Gal; y Carril 8 - 1160 ng de β -Gal. Las membranas se expusieron con sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 100 s. La flecha muestra la posición de β -Gal sobre la membrana.

Figura 41: Comparación de la densidad de señal de detección WB del péptido interferidor Tango 2 (*b*-RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 80)) (línea negra con círculos) y anticuerpo anti- β -Gal (línea roja con triángulos) de diferentes niveles de proteína β -gal añadida en lisados celulares completos BL21 no inducidos.

Figura 42: influencia de restos constitutivos en la especificidad de la detección de péptido interferidor basada en PepBlot de β -gal en lisado completo de *E. coli* en presencia de proteínas séricas en el carril adyacente. La detección se llevó a cabo en una plataforma competitiva con el carril 1 de cada membrana conteniendo suero clínico al 7% y el carril 2 es la β -gal en lisado celular completo de *E. coli* BL21. Los péptidos se marcaron con biotina en ambos extremos y se unieron mediante enlazador Ttds. Las membranas que contenían suero separado y proteínas de *E. coli* se incubaron con péptidos interferidores 25 nM durante 15 min, seguido de conjugado SRP-HRP y se expusieron a sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 120 s. Obsérvese que la banda de alto PM observada para suero se debe a la reacción cruzada del conjugado SRP-HRP.

Figura 43: Sensograma experimental que compara la afinidad de diversos péptidos por la unión a β -Gal: Tango 1 (rojo), Tango 2 (verde, curva mayor), péptido fuera de la diana (amarillo) y la referencia de tampón (negro). Obsérvese que los péptidos (1 μ M) fluyeron sobre la misma microplaca con una etapa de regeneración de la superficie después de cada contacto.

Figura 44: Sensograma experimental que compara la afinidad de diversos péptidos Tango 2 de ts y mutantes por la unión a β -Gal: Tango 2 ts (rojo, curva mayor), Tango 2 Mut_1 (verde), Tango 2 Mut_2 (amarillo), Tango 2 Mut_3 (azul) y la referencia de tampón (negro). Obsérvese que los péptidos (1 μ M) fluyeron sobre la misma microplaca con una etapa de regeneración de la superficie después de cada contacto.

Figura 45: Sensograma representativo de datos ajustados a partir del análisis cinético del péptido, (His)₆-RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 80), que se une a β -Gal inmovilizado sobre la placa sensora. La línea continua es el sensograma experimental y la línea de puntos superpuesta sobre la respuesta es la curva ajustada. Las concentraciones de analito fueron, de la parte inferior a la superior, 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M, 2,5 μ M, 3,0 μ M, 3,5 μ M y 4,0 μ M. La curva de en medio (2 μ M) se ejecutó por duplicado. Obsérvese que los péptidos fluyeron sobre la misma placa con una etapa de regeneración de la superficie después de cada contacto.

Figura 46: Sensograma experimental que compara la afinidad de péptidos Tango 2 individuales (línea continua) y Tango 2 en tándem (línea discontinua) por la unión a β -Gal. La referencia de tampón se muestra como línea de puntos. Obsérvese que los péptidos (1 μ M) fluyeron sobre la misma microplaca con una etapa de regeneración de la superficie después de cada contacto.

Figura 47: Comparación de la cinética de co-agregación del péptido Tango 1 (triángulo) y el péptido Tango 2 (cuadrado) con β -gal. Las concentraciones de péptidos interferidores y de β -gal fueron 10 μ M. Los círculos negros representan la β -gal en ausencia del péptido. Las flechas apuntan al radio hidrodinámico (RH) de las partículas medido usando DLS en el punto de tiempo respectivo.

Figura 48: Comparación de la cinética de co-agregación de péptido Tango 2 individual (cuadrado) y péptido Tango 2 de repetición en tándem (triángulo) con β -gal. La cantidad de péptidos interferidores y de β -gal fueron de 10 μ M. Los círculos negros representan β -gal en ausencia del péptido. Las flechas apuntan al radio hidrodinámico (RH) de las partículas medido usando DLS en el punto de tiempo respectivo.

Figura 49: Efecto de la concentración de péptido en la cinética de co-agregación del péptido Tango 2 con β -gal.

La relación molar de péptido a β -gal fue: 1:5 (triángulo), 1:2 (cuadrado) y 1:1 (rombo). Los círculos negros representan la β -gal en ausencia del péptido. Las flechas apuntan al radio hidrodinámico (RH) de las partículas medido usando DLS en el punto de tiempo respectivo.

Figura 50: Efecto del péptido interferidor Tango 2 en la actividad enzimática de β -gal para escindir el sustrato no fluorescente FDG en fluoresceína fluorescente. La máxima intensidad de fluorescencia se obtiene con beta-Gal nativa 10 μ M sin interferidor, seguido de β -Gal 10 μ M + péptido interferidor 1 μ M, seguido de beta-Gal 10 μ M + péptido interferidor 5 μ M. No se observó fluorescencia en la condición de β -Gal 10 μ M + péptido interferidor 10 μ M.

Figura 51: Espectro de FT-IR de reflectancia total atenuada de β -Gal nativa (línea sólida) y suspensión de coagregado de β -Gal-péptido interferidor Tango 2 (línea de puntos) en PB 20 mM, pH 6,8.

Figura 52: Espectro de CD de β -Gal nativa (línea sólida) y suspensión de coagregado de β -Gal-péptido interferidor Tango 2 (línea de puntos) en PB 20 mM, pH 6,8.

Figura 53: EM de (A) β -Gal nativa y (B) coagregado de β -Gal-péptido interferidor Tango 2.

Figura 54: Análisis PepBlot y WB de PSA usando péptido interferidor, brRQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 85) (panel A) y anticuerpo monoclonal de conejo anti-PSA (panel B). La membrana contiene 1,55 μ g de PSA añadido en suero humano al 5%. La flecha indica la posición del PSA en las transferencias. Las membranas con péptido interferidor y anticuerpo anti-PSA se expusieron a sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 180 s y 10 s, respectivamente. La banda de alto peso molecular perceptible en PepBlot y WB se debe a la unión no específica del conjugado SRP-HRP y al anticuerpo secundario-HRP, respectivamente.

Figura 55: Análisis PepBlot y WB de 1,25 μ g de CRP añadido en suero humano al 5% usando péptido interferidor, b~RILIFWSR (SEQ ID NO: 86) (panel A) y anticuerpo monoclonal de conejo anti-CRP (panel B). Las membranas con péptido interferidor y anticuerpo anti-CRP se expusieron a sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 60 s y 10 s, respectivamente. La flecha indica la posición del CRP en las transferencias. La banda de alto peso molecular perceptible en la transferencia de interferidor y anticuerpo se debe a la unión no específica del conjugado SRP-HRP y al anticuerpo secundario-HRP, respectivamente.

Figura 56: Análisis PepBlot y WB de 0,6 μ g de β -2M añadido en suero humano al 5% usando péptido interferidor, b~RWSFYLLYYTR (SEQ ID NO: 87) (panel A) y anticuerpo anti- β -2M (panel B). Las membranas con péptido interferidor y anticuerpo anti- β -2M se expusieron a sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 180 s y 10 s, respectivamente. La flecha indica las posiciones de β -2M en las transferencias.

Figura 57: Detección de CRP en muestras clínicas de suero mediante WB usando anticuerpo monoclonal de conejo anti-CRP y PepBlot usando péptido interferidor b~RILIFWSR (SEQ ID NO: 86).

Figura 58: Detección de CRP en muestras clínicas de suero de 20 pacientes mediante PepBlot usando el péptido interferidor b~RILIFWSR (SEQ ID NO: 86) (panel superior). Las concentraciones de CRP en suero clínico determinadas mediante ensayo inmunoturbidimétrico se encontraron en el intervalo de 1 μ g ml⁻¹ a 317 μ g ml⁻¹. El panel inferior muestra la representación de la densidad de señal de la banda de CRP detectada por el péptido b~RILIFWSR (SEQ ID NO: 86) frente a la concentración determinada de manera independiente con un ensayo inmunoturbidimétrico en un laboratorio clínico.

Figura 59: (A) Detección de PSA secretado en plasma seminal humano mediante PepBlot usando los péptidos b~RWQVLASD (SEQ ID NO: 88) (carril 2) y b~RQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 85) (carril 3). La WB del anticuerpo monoclonal (EP1588Y) específico para la secuencia C-terminal de PSA se muestra en el carril 1. (B) Detección de PSA usando el péptido interferidor de repetición en tándem b~RQWVLT AARGSGSAPAARQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 89). La biotina (b) se une al péptido mediante el enlazador 'Ttds-APAA' (SEQ ID NO: 77) y las dos secuencias agregantes se unieron mediante el enlazador 'GSGSAPAA' (SEQ ID NO: 90). Obsérvese que la concentración del péptido individual y de repetición en tándem fue de 250 nM y 250 pM, respectivamente. Las membranas se expusieron a sustrato de HRP de quimioluminiscencia durante 36 s.

Figura 60: Detección por PepBlot (es decir, basada en interferidor) de 5 μ g de IL1 β añadida en suero humano al 5%.

Figura 61: Detección por PepBlot de 5 μ g de TNF α añadido en suero humano al 5%.

Figura 62: Detección cuantitativa de diferentes niveles de β -gal añadida en lisados celulares completos de *E. coli* usando el péptido b~RVIIWSLGNRSGSAPAARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 91). La biotina (b) se une al péptido mediante el enlazador 'Ttds-APAA' (SEQ ID NO: 77) y las dos secuencias agregantes se unieron mediante el enlazador 'GSGSAPAA' (SEQ ID NO: 90).

Figura 63: Caracterización cinética de la interacción del péptido b~RVIIWSLGNRSGSAPAARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 91) con β -Gal. Las concentraciones de la proteína diana β -Gal se encontraron en el intervalo de 31 pM a 1 μ M.

Figura 64: Caracterización cinética de la interacción del péptido b~RILIFWSRSGSAPAARILIFWSR (SEQ ID NO: 92) con CRP. Las concentraciones de la proteína diana CRP se encontraron en el intervalo de 37 μ M a 582 mM.

Figura 65: Detección de CRP en suero clínico usando micromatriz de péptido interferido individual flanqueado por "R" (panel superior) o de péptido interferidor de repetición en tándem flanqueado por "R" (panel inferior). El eje X muestra los péptidos punteados, el eje Y indica la relación de señal a ruido. La concentración de CRP en el suero fue de 317 μ g ml⁻¹.

Figura 66: A, análisis de transferencia de Western de fosfo-ERK1/2 y total de células Hek293 transfectadas con mVEGFR2, seguido de una privación de alimento durante una noche en presencia o ausencia de péptidos de diferentes fuentes y estimuladas durante 5 minutos con VEGF (25ng/ml). B, cuantificación de la relación de niveles de ERK1/2 fosforilado frente al total para algunos de los péptidos mostrados en A.

- Figura 67:** Especificidad del péptido B8 frente al receptor de VEGFR2. Análisis de transferencia de Western para ERK1/2 fosforilado en células HeLa que se estimularon durante 5 min con EGF (25ng/ml) después de una privación de alimento durante una noche en presencia de DMSO o péptido B8 a la concentración indicada. No pudo observarse una reducción en la fosforilación de ERK1/2 inducida por los péptidos dirigidos contra VEGFR2.
- 5 **Figura 68:** Tinción inmunohistoquímica para mVEGFR2, expresado en células HEK293 tratadas con DMSO (panel superior) o con péptido B8 10 μ M (panel inferior).
- Figura 69:** Neovascularización de vasos en el ojo de ratones tratados con control, péptidos interferidores anti-VEGFR2 o mAb anti-VEGFR2. El eje Y indica el % de área positiva a TRITC frente al borde del área total de la lesión.
- 10 **Figura 70:** Niveles de ERK1/2 fosforilado en células HeLa tras estimulación con EGF, en presencia o ausencia de péptidos dirigidos contra EGFR. El eje Y muestra los niveles de fosfo-ERK corregidos respecto del control negativo. Secuencia de A5, RWGLLLALRPPRWGLLLALR (SEQ ID NO: 93); A11, RTGYLYISRPPRTGYLYISR (SEQ ID NO: 94); A12, RIISAWGRPPRIISAWGR (SEQ ID NO: 95); B9, DVWSYGVTDPPDVWSYGVTD (SEQ ID NO: 96); B10, DITGYLYIDPPDITGYLYID (SEQ ID NO: 97); B11, DLLGISLTDPPDLLGISLTD (SEQ ID NO: 98); B12, DWGLLLALDPPDWGLLLALD (SEQ ID NO: 99)
- 15 **Figura 71:** Inducción de A20 (transferencia de Western en el panel superior) e IL-8 (ELISA en el panel intermedio) o IL-6 (bioensayo en el panel inferior) en diferentes puntos de tiempo tras estimulación con hTNF.
- Figura 72:** Inducción relativa de niveles de IL-8 de células A549 tratadas con diferentes interferidores tras su estimulación con TNF, en comparación con el tratamiento con medio aséptico y DMSO al 2% (DMSO en la figura). A y B muestran los resultados de 2 experimentos independientes.
- 20 **Figura 73:** Inducción relativa de niveles de IL-6 de células A549 tratadas con diferentes interferidores tras su estimulación con TNF, en comparación con el tratamiento con medio aséptico y DMSO al 2% (DMSO en la figura).
- Figura 74.** (a) Diagrama de gráfica TANGO para BIN2; los picos representan las secuencias peptídicas con la mayor propensión a la agregación dentro de la proteína BIN2. (b) Representación esquemática de los vectores de expresión de bait249 que contienen un reforzador de la agregación fusionado en N-terminal a GFP. (c) Representación de vectores de expresión de bait249 que incluyen diferentes secuencias enlazadoras y flanqueantes (se indican las secuencias de aa) pero que no contienen ningún reforzador de la agregación.
- 25 **Figura 75.** (a-e) Evaluación CLSM de la formación de agregados en hojas agro-infiltradas con *N. benthamiana* transformadas transitoriamente con las construcciones de expresión de GFP indicadas sobre cada panel. Las células epidérmicas son positivas a GFP pero muestran diferentes patrones de localización, principalmente en el área perinuclear. La flecha blanca indica un cuerpo de inclusión insoluble. Barras de tamaño: 10 μ m.
- 30 **Figura 76.** Panel superior: Imágenes de CLSM de células epidérmicas de *N. benthamiana* después de 4,5 días desde la inyección conjunta de 35S::BIN2GFP y pMDCbait249NF_T y cepas de expresión. Panel inferior: imágenes correspondientes que representan la cuantificación de la colocalización llevada a cabo mediante el programa informático ImageJ MBF. Se indican los coeficientes de solapamiento de Mander ($0 < R < 1$) para cada imagen; las barras de tamaño representan 50 μ m.
- 35 **Figura 77.** Co-inmunoprecipitación de variantes de 35S::bait249-GFP expresadas conjuntamente en *N. benthamiana* con 35S::BIN2:HA. En el panel izquierdo, la detección de transferencia de Western de las fracciones no unidas de los extractos de proteínas vegetales después de 4 horas de incubación con perlas anti-GFP y detección con anticuerpo anti-HA (panel superior izquierdo) o con anticuerpos anti-GFP (panel inferior izquierdo). En el panel derecho, la detección de las perlas inmunoprecipitadas (IP) con anticuerpo anti-HA (panel superior derecho) o anti-GFP (panel inferior derecho).
- 40 **Figura 78.** (a-d) Imágenes CLSM de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.A.S. T3 que expresan la construcción 35S::bait249R-GFP. Las células epidérmicas en los cotiledones (a), el hipocótilo (b) y las células radiculares (c) muestran agregación perinuclear (flechas blancas). La punta radicular muestra una agregación citosólica no clara y una señal débil de GFP (d). (e-h) Imágenes CLSM de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.A.S. T3 que expresan la construcción 35S::bait249NF_Tand-GFP. Las células epidérmicas en los cotiledones (e), el hipocótilo (f) y las células radiculares (g) muestran agregación citosólica. La punta radicular muestra una intensidad de GFP más débil (h). Se indican las barras de tamaño.
- 45 **Figura 79.** (a-d) Imágenes CLSM de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.A.S. T3 que expresan la construcción 35S::bait249-GFP. No es visible una agregación evidente en los tejidos vegetales, pero solo es visible una débil expresión de GFP en las células en los cotiledones (a), hipocótilos (b) y la punta radicular (d). En las células radiculares (c), se evidencia la presencia de agregados insolubles en forma de cuerpos de forma redonda (flecha blanca). (e-h) Imágenes CLSM de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.A.S. T3 que expresan la construcción 35S::bait249NF-GFP. El señuelo se expresa en cualquier tejido vegetal que muestre agregación perinuclear únicamente en las células de la raíz (g). Se indican las barras de tamaño.
- 50 **Figura 80.** Evaluación TEM de secciones ultrafinas marcadas con inmuno-oro de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.A.S. incubadas con un anticuerpo anti-GFP. (a) Células parenquimales vasculares del hipocótilo que expresan 35S::bait249R-GFP que muestran material fibrilar citosólico marcado (a) agrandado en el recuadro. (b-c) Detalles de las células del área de alargamiento de la raíz que muestran marcaje acumulado debait249NF_Tand-GFP en el citosol (b) y próximo a la pila de Golgi (c). (d) Célula de empalizada del cotiledón que expresa bait249NF_Tand-GFP que evidencia el marcaje perinuclear, agrandado en el recuadro. (e) Célula del área de elongación de la raíz que muestra marcaje citoplasmático de bait249NF_T y en el citosol. Se indican las barras de tamaño.
- 55 **Figura 81.** (a) Detección de PAGE nativo y anti-GFP de complejos de alto peso molecular (recuadrados) en extractos de proteínas de plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan de manera estable las líneas BIN2
- 60
- 65

bait249 con respecto a extractos de plantas de tipo silvestre (Col-0). (b,c) Espectroscopía de FT-IR en material inmunoprecipitado de plantas transgénicas que expresan 35S::bait249-GFP, 35S::bait249R-GFP, 35S::bait249NF_Tand-GFP y 35S::bait249NF-GFP. El aumento de la absorbancia a valores de 1616 y a 1680 (flechas negras) indica la presencia de agregados de lámina β .

Figura 82. (a) Fenotipo de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP de plántulas de *Arabidopsis* en comparación con Col-0 cultivadas verticalmente *in vitro* durante 8 días sometidas a un fotoperíodo de día largo y en suelo durante 1,5 meses. También se representa la cuantificación de la longitud de las raíces y los hipocótilos en una media de 50 plántulas de 8 D.A.S. por línea. (b) Ensayo de respuesta a la dosis de resistencia a brassinazol para líneas de plántulas de *Arabidopsis* 4 D.A.S. de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP en comparación con Col-0 y triple mutante GSKs grupo II T-ADN (trGSKsII_k.o.). Se representa en la gráfica la cuantificación correspondiente de las longitudes de los hipocótilos en una media de 50 plántulas por línea.

Figura 83: a) Niveles de expresión relativos de los genes biosintéticos de BR *DWF4* y *CPD* y del gen para el factor de transcripción NAC que responde a BR (At5g46590) en plántulas de *Arabidopsis* 8 D.O. cultivadas *in vitro* en condiciones de día largo. b) Niveles de expresión de los genes de chaperona (*HSP70*, *HSP90-1*, *HSP101*, *HSC70-1*, *HSC70-2* y *HSC70-3*) medidos en las mismas condiciones experimentales. En cada caso, se normalizó la cantidad de ARNm al nivel de *CDKA1* como gen de referencia.

Figura 84. Evaluación ultraestructural TEM de la citotoxicidad de 35S::bait249R-GFP en plantas de *Arabidopsis*. Se muestra una comparación a bajo aumento entre los hipocótilos y las células de la raíz en Col-0 (a,c) y el mutante (e,g). Micrografías de alto aumento de las mismas áreas en Col-0 (b,d) y mutante (f,h). Se indican las barras de tamaño.

Figura 85. Panel superior: Imágenes de CLSM de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.A.S. que expresan 35S::BIN2-GFP y pMDC::bait249NF_Tand_RFP después de 24 horas de la inducción. Panel inferior: imágenes correspondientes que representan la cuantificación de la colocalización llevada a cabo mediante el programa informático ImageJ MBF. Se indican los coeficientes de solapamiento de Mander ($0 < R < 1$) para cada imagen.

Descripción detallada

Definiciones

La presente invención se describirá respecto de realizaciones particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención no se limita a los mismos, sino únicamente por las reivindicaciones. No ha de interpretarse cualquier signo de referencia en las reivindicaciones como limitante del alcance. Las figuras descritas son solo esquemáticas y no limitantes. En los dibujos, puede exagerarse el tamaño de algunos de los elementos y no dibujarse a escala con fines ilustrativos. En los casos donde se usa el término "comprende" en la presente descripción y las reivindicaciones, esto no excluye otros elementos o etapas. En los casos donde se usa un artículo definido o indefinido cuando se hace referencia a un nombre en singular, por ejemplo, "un" o "una", "el" o "la", esto incluye un plural de ese nombre, a menos que se indique específicamente otra cosa.

Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Ha de entenderse que los términos usados de este modo son intercambiables en las condiciones adecuadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden funcionar en otras secuencias a las descritas o ilustradas en el presente documento.

Se proporcionan los siguientes términos o definiciones únicamente para ayudar a comprender la invención. A menos que se definan específicamente en el presente documento, todos los términos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entendería un experto en la materia de la presente invención. Remítase a los expertos, en particular, a Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York (1989); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999), para definiciones y términos de la especialidad. No debe interpretarse que las definiciones proporcionadas en el presente documento tengan un alcance menor que el entendido por un experto habitual en la materia.

Las moléculas de inducción de agregación beta o de agregación-nucleación descritas en el presente documento se citan en ocasiones como "interferidores" o "moléculas interferidoras". Con este término, se entienden las moléculas que contienen restos constitutivos como se han descrito en el presente documento (es decir, las moléculas con restos X_{2i-1} y X_{2i}), por lo tanto, el término no es sinónimo a los "interferidores" usados en el documento WO2007071789. Tal como se usa en el presente documento, los "interferidores" deben interpretarse, por lo tanto, como moléculas con la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$. En ocasiones se usa la expresión "péptidos interferidores", en caso de que sean de naturaleza completamente peptídica. El término "señuelo" también se usa en ocasiones como sinónimo, aunque este también puede referirse a la región de agregación en sí. Las moléculas interferidoras, tal como se describen en el presente documento, son moléculas de origen no natural. Son sintéticas (en tanto que son producidas por el hombre) y no se pretende que abarquen fragmentos de proteína (debido a los requisitos de secuencia específicos y es improbable que los fragmentos de proteína naturales hallados en organismos se ajusten a esta definición).

- Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácidos hidrofóbicos" se refiere a los 13 aminoácidos siguientes: isoleucina (I), leucina (L), valina (V), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), histidina (H), metionina (M), treonina (T), lisina (K), alanina (A), cisteína (C) y glicina (G). La expresión "aminoácidos alifáticos" se refiere a restos de I, L o V. La expresión "aminoácidos cargados" se refiere a arginina (R), lisina (K) - ambos con carga positiva; y ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) - ambos con carga negativa. Aunque en ocasiones la histidina se cita como con carga positiva, ya que el nitrógeno en su cadena lateral puede protonarse en condiciones ácidas, en el presente documento no se prevé entre los aminoácidos cargados, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Esto se debe a que la carga positiva en condiciones fisiológicas no es comparable con la de los restos de R o K y la carga en condiciones fisiológicas es la que cobra importancia en el presente documento.
- A lo largo de la solicitud, se usará la notación de una letra convencional de los aminoácidos. Típicamente, el término "aminoácido" se referirá a "aminoácido proteínogénico", es decir, aquellos aminoácidos que están presentes de manera natural en las proteínas. Más particularmente, los aminoácidos se encuentran en la forma isomérica L. También se prevén D-aminoácidos, pero normalmente tienen diferentes propensiones a la agregación.
- La expresión "una serie de X aminoácidos contiguos de origen natural en una proteína", en donde X es un número, tal como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que estos X aminoácidos están presentes como una serie no interrumpida, en el mismo orden, en una proteína de un organismo. En otras palabras, la serie corresponde a la secuencia exacta de la proteína a lo largo de X restos.
- La "carga total" de una serie de aminoácidos es la suma del número de aminoácidos cargados positivamente menos la suma del número de aminoácidos cargados negativamente o viceversa. Tal como se usa en el presente documento, siempre es un valor absoluto. Por lo tanto, en caso de que una serie contenga, por ejemplo, un resto cargado positivamente y tres aminoácidos cargados negativamente, la carga total de esa serie es dos.
- El término "monómero", tal como se usa en la solicitud, es un átomo o una molécula pequeña que puede unirse químicamente a otros monómeros para formar un polímero. Esto puede hacer referencia a monómeros naturales, tales como aminoácidos (cuyos polímeros son polipéptidos o proteínas), nucleótidos (cuyos polímeros son ácidos nucleicos) o monosacáridos, por ejemplo, glucosa, cuyos polímeros son almidones, glucógeno o glucosa; o xilosa, cuyo polímero es el xilano). Más particularmente, sin embargo, en el presente documento se usa el término monómero para referirse a moléculas orgánicas que no pertenecen a estas tres categorías, que pueden formar polímeros sintéticos o naturales diferentes, tales como, por ejemplo, cloruro de vinilo o isopreno. Un monómero particularmente previsto es el óxido de etileno, cuyo oligómero o polímero es el polietilenglicol (PEG), también citado en ocasiones como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE).
- En el contexto de los monómeros, se usa una "unidad de la misma naturaleza" para referirse a monómeros con la misma estructura general, pero no necesariamente idénticos. Por ejemplo, dos aminoácidos diferentes son unidades de la misma naturaleza, mientras que un aminoácido y un monosacárido son unidades de naturaleza diferente.
- Un "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere normalmente tanto a "sujetos animales" como a "sujetos vegetales". Se usa un "sujeto animal" para referirse a un organismo vertebrado, más en particular, un mamífero, más en particular, un ser humano. Los sujetos mamíferos particularmente previstos son aquellos que se tienen como mascotas, tales como perros, gatos, conejos, gerbos, hámsteres, chinchillas, ratones, ratas, cobayas, burros, mulas, hurones, cabras pigmeas, cerdos vietnamitas, mascotas aviares, tales como canarios, periquitos, loros, pollos, pavos; reptiles mascotas, tales como lagartos, serpientes, galápagos y tortugas; y mascotas acuáticas, tales como peces, salamandras y ranas. Otros animales particularmente previstos son especies usadas para análisis toxicológicos, tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, cerdos, monos, hurones y ovejas. También se prevén animales de granja, tales como alpaca, banteng, bisonte, camello, ganado bovino (vacas), ciervo, burro, gayal, cabra, caballo, llama, mula, cerdo, pony, reno, oveja, búfalo y yak. Un "sujeto vegetal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a organismos vivos del reino *Plantae*. Las plantas particularmente previstas incluyen cultivos comerciales (es decir, cultivos cultivados para obtener un beneficio), tales como, pero sin limitación, maíz, arroz, trigo, soja, cebada, sorgo, mijo, avena, centeno, triticale, alforfón, quinoa, fonio, einkorn, trigo duro, patata, café, cacao, mandioca, té, árbol del caucho, palmera de cocos, palma de aceite, caña de azúcar, remolacha azucarera, banano, naranjo, árbol de la piña, manzano, peral, limonero, olivo, árbol del cacahuete, judía verde, lechuga, tomate, zanahoria, calabacín, coliflor, colza, jatropha, mostaza, jojoba, lino, girasol, algas verdes, yute, algodón, cáñamo (u otras variedades de *Cannabis sativa*), colza o tabaco. Un "organismo", tal como se usa a lo largo de la solicitud, se refiere a cualquier sistema viviente contiguo (tal como un animal, hongo, microorganismo o planta), así como virus (ya que estos también son entidades separadas ("sistema contiguo") que contienen proteínas). Los organismos particularmente previstos son sujetos (véase lo anterior), los organismos previstos que no son sujetos incluyen organismos invertebrados, tales como especies de *Drosophila* o especies de *Caenorhabditis*. También se prevén particularmente microorganismos y/u organismos patógenos.
- Una "infección", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la colonización de un organismo hospedador (normalmente un sujeto) por un parásito o especie patógena (organismos). Los patógenos o parásitos infecciosos pretenden usar los recursos del hospedador para reproducirse, normalmente causando una enfermedad infecciosa. En el presente documento, "enfermedad infecciosa" se usa para referirse a cualquier tipo de enfermedad causada por la presencia de un organismo externo (patógeno) en o sobre el sujeto u organismo con la enfermedad. Normalmente, se considera que las infecciones están causadas por microorganismos o microparásitos, tales como

virus, priones, bacterias y viroides, aunque también pueden causar infecciones organismos mayores, tales como macroparásitos y hongos. Los organismos que causan infección se citan en el presente documento como "patógenos" (en caso de que provoquen enfermedades) y "parásitos" (en caso de que se beneficien a expensas del organismo hospedador, reduciendo de este modo la salud biológica del organismo hospedador, incluso si no hay presente una enfermedad manifiesta) e incluyen, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos, protistas (por ejemplo, *Plasmodium*, *Phytophthora*) y protozoos (por ejemplo, *Plasmodium*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Leishmania*, *Trypanosoma*) (microparásitos) y macroparásitos, tales como gusanos (por ejemplo, nematodos tales como ascáridos, filarias, anquilostomas, oxiuros y tricocéfalos o platelmintos, tales como tenias y duelas), pero también ectoparásitos, tales como garrapatas y ácaros. Los parasitoides, es decir, organismos parásitos que esterilizan o matan al organismo hospedador, también se prevén dentro del término parásitos. De acuerdo con realizaciones particulares donde las moléculas pueden administrarse directamente a ectoparásitos en lugar de a través del organismo hospedador, se prevé que no se incluyan los ectoparásitos en el sentido de parásitos que causan una infección.

Obsérvese que aunque normalmente se usa enfermedad infecciosa para sujetos que son animales, en particular, mamíferos, lo más en particular, seres humanos, se prevé en el presente documento que se aplique enfermedades infecciosas también a plantas (especialmente cuando se refiere a enfermedades en un organismo). De hecho, los patógenos de plantas también pueden causar infecciones en plantas e incluyen, pero sin limitación, hongos (por ejemplo, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Oomycetes*), bacterias, *Phytoplasma*, *Spiroplasma*, virus, nematodos, protozoos y plantas parásitas.

Una "plaga" o "plaga de plantas", tal como se usa en la solicitud, se refiere a organismo que causan daño a las plantas, en particular, plantas usadas en agricultura. Obsérvese que la expresión "plaga de plantas" se usa en el sentido de que la plaga ataca a plantas, no siendo necesariamente el caso de que la plaga sea una especie vegetal. De hecho, las plagas son particularmente animales (vertebrados que comen o destruyen las plantas o invertebrados), otras plantas (malas hierbas del cultivo y plantas parásitas), microorganismos y virus. Más particularmente, las plagas son animales invertebrados (por ejemplo, insectos (incluyendo plagas agrícolas de insectos, plagas de insectos de plantas ornamentales, plagas de insectos silvícolas, insectos vectores de patógenos en humanos, animales o vegetales. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, áfidos, orugas, moscas, avispas y similares), nematodos (que viven libres en el suelo o en particular, especies que parasitan raíces de plantas, tales como el nematodo de la anguilulosis, nematodo del quiste de la soja y nematodo del quiste de la patata), ácaros (tales como arañuela roja común, ácaros con patas de hilo y ácaro de las agallas) y gasterópodos (incluyendo babosas, tales como *Deroceras* spp., *Milax* spp., *Tandonia* sp., *Limax* spp., *Arion* spp. y *Veronicella* spp. y caracoles, tales como *Helix* spp., *Cernuella* spp., *Theba* spp., *Cochlicella* spp., *Achatina* spp., *Succinea* spp., *Ovachlamys* spp., *Amphibulima* spp., *Zachrysis* spp., *Bradybaena* spp. y *Pomacea* spp.), hongos patógenos (incluyendo *Ascomycetes* (tales como *Fusarium* spp., *Thielaviopsis* spp., *Verticillium* spp., *Magnaporthe* spp.), *Basidiomycetes* (tales como *Rhizoctonia* spp., *Phakospora* spp., *Puccinia* spp.) y *Oomycetes* similares a hongos (tales como *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.), bacterias (tales como *Burkholderia* spp. y proteobacterias, tales como *Xanthomonas* spp. y *Pseudomonas* spp.), *Phytoplasma*, *Spiroplasma*, virus (tales como el virus del mosaico del tabaco y el virus del mosaico de la coliflor) y protozoos. El término "plaga" se solapa significativamente con los "patógenos" y "parásitos" relacionados con infecciones, en particular para microorganismos y virus. Sin embargo, para plagas de plantas, siempre se incluyen en la definición ectoparásitos y animales (invertebrados) que se alimentan de las plantas.

Las "enfermedades no infecciosas" son todas las enfermedades que no son enfermedades infecciosas, es decir, son aquellas enfermedades que no están causadas por un patógeno y que no pueden transmitirse de una persona a otra. Las enfermedades no infecciosas pueden estar causadas por el ambiente, deficiencias nutricionales, elecciones de estilo de vida o herencia genética e incluyen, por ejemplo, la mayoría de las formas de cáncer, asma y enfermedad cardíaca. Una clase particularmente prevista de enfermedades no infecciosas es los trastornos fisiológicos que están causados por las propias proteínas del organismo con la enfermedad (por ejemplo, mediante expresión aberrante o mediante mutación).

Tal como se usa en la solicitud, la expresión "resistencia a fármacos" se refiere a una reducción en la eficacia de un fármaco para curar una enfermedad o afección. En particular, se aplica en el contexto de resistencia adquirida por los patógenos. Cuando un organismo es resistente a más de un fármaco, se dice que es resistente a múltiples fármacos. La expresión "resistencia a antibióticos", tal como se usa en el presente documento, es un tipo de resistencia a fármacos, donde un microorganismo es capaz de sobrevivir a la exposición a un antibiótico. Para determinar, en la práctica, la resistencia a antibióticos, puede usarse el punto de corte clínico. Un punto de corte para antibióticos es un umbral máximo de CIM (concentración inhibidora mínima, la menor concentración de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo tras su incubación) para predecir una terapia exitosa con antibióticos. Durante el intervalo de dosificación con el anticuerpo, se espera que se inhiban (al menos parcialmente) o se eliminen los organismos con una CIM en este o por debajo de este umbral. En otras palabras, en caso de que el valor de CIM de un antibiótico para un organismo dado sea mayor que el valor de punto de corte de este antibiótico para el microorganismo dado, se dice que el microorganismo es resistente. Los puntos de corte clínicos se evalúan y monitorizan por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés) en Europa y en su página web pueden encontrarse valores de punto de corte. Los puntos de corte clínicos también se determinan independientemente por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

(CLSI, por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos, estos son reconocidos por la FDA.

La resistencia a fármacos y en particular, a antibióticos, puede ser resistencia natural (por ejemplo, debido a que la proteína usada como diana por el fármaco no está presente en el organismo) o puede ser resistencia adquirida (por ejemplo, mediante mutaciones, que pueden ser en el gen usado como diana por el fármaco o mediante mutaciones que, por ejemplo, aumentan la actividad de bombas de eflujo, de tal forma que el fármaco (por ejemplo, antibiótico) se elimina del organismo microbiano. Como alternativa, la resistencia puede adquirirse mediante transferencia génica horizontal, lo que significa que (para antibióticos), los organismos microbianos que son resistentes a un antibiótico concreto intercambian información genética con organismos microbianos (de la misma especie o de otra diferente) que son sensibles a ese antibiótico, haciendo de este modo que el organismo sensible sea resistente).

Un "biofilm", tal como se usa en el presente documento, es un agregado de microorganismos en el que las células se adhieren entre sí y/o a una superficie. Estas células adherentes se incluyen frecuentemente en una matriz producida por ellas mismas compuesta generalmente de ADN extracelular, proteínas y polisacáridos en diversas configuraciones. Los biofilms pueden contener muchos tipos diferentes de microorganismos, por ejemplo, bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas. Sin embargo, también se producen biofilms de una sola especie. Los microorganismos que viven en un biofilm tienen normalmente propiedades significativamente diferentes a las de los microorganismos flotantes (planctónicos) de la misma especie, a consecuencia del ambiente denso y protegido de la película. Por ejemplo, a menudo se observa un aumento de la resistencia a los detergentes y antibióticos, ya que la densa matriz extracelular y la membrana externa de las células protegen al interior de la comunidad. La formación de biofilms es un problema frecuentemente observado en la cirugía de implantes, ya que pueden formarse biofilms sobre las superficies inertes de los dispositivos implantados, tales como catéteres, estents, prótesis de válvulas cardíacas y dispositivos intrauterinos.

La expresión "identidad de secuencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere al grado en que las secuencias son, basándose en sus nucleótidos o basándose en sus aminoácidos, idénticas a lo largo de una ventana de comparación. Por lo tanto, se calcula un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gin, Cys y Met) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. A efectos de la presente invención, se entenderá que "identidad de secuencia" significa el "porcentaje de coincidencia" calculado mediante el programa informático DNASIS (versión 2.5 para Windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, Calif., EE. UU.) usando los valores por defecto, tal como se usan en el manual de referencia que acompaña al programa. "Similitud" se refiere al porcentaje del número de aminoácidos que son idénticos o que constituyen sustituciones conservativas. La similitud puede determinarse usando programas de comparación de secuencia tales como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De este modo, pueden compararse secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente respecto de las citadas en el presente documento mediante inserción de huecos en el alineamiento, determinándose dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación usado por GAP.

Una "micromatriz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una matriz en 2D sobre un sustrato sólido. Puede servir como ensayo multiplexado, es decir, medir simultáneamente múltiples analitos (hasta docenas o más) en un solo ensayo. Puede usarse en un dispositivo de laboratorio sobre una placa, que emplea microfluidos. Como sustrato sólido, normalmente se usan portaobjetos de vidrio o geles de lámina fina de silicio, pero también pueden usarse otros materiales (por ejemplo, nitrocelulosa, plásticos, ...). Ya que las moléculas presentadas en el presente documento se unen a proteínas, una micromatriz recubierta con moléculas también puede citarse como una micromatriz de proteínas, micromatriz de unión a proteínas o placa de proteínas. Las micromatrices de proteínas se usan generalmente en aplicaciones biomédicas para determinar la presencia y/o cantidad (citada como cuantificación relativa) de proteínas en muestras biológicas. Típicamente, en las micromatrices descritas en el presente documento, se usan las moléculas de la solicitud como moléculas de captura punteadas o sintetizadas sobre la micromatriz.

Estructura de las moléculas

Estructura general

La presente memoria descriptiva describe moléculas (que incluyen moléculas de acuerdo con los aspectos y realizaciones de la invención) que pueden describirse con la siguiente fórmula:

$(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos

un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y

- 5 - cada Z_i es un enlazador seleccionado independientemente y Z_n es un enlazador o está ausente.

Por lo tanto, esta fórmula abarca las siguientes estructuras:

$X_1-Y_1-X_2-Z_1$ (es decir, $n=1$),

$X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2$ (es decir, $n=2$),

- 10 $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2-X_5-Y_3-X_6-Z_3$ (es decir, $n=3$),

$X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2-X_5-Y_3-X_6-Z_3-X_7-Y_4-X_8-Z_4$ (es decir, $n=4$) y

$X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2-X_5-Y_3-X_6-Z_3-X_7-Y_4-X_8-Z_4-X_9-Y_5-X_{10}-Z_5$ (es decir, $n=5$), en donde cada X, Y y Z numerado es como se ha definido anteriormente.

15 *Restos Y_i : Regiones de agregación-nucleación*

Los restos Y_i numerados en estas moléculas son regiones inductoras de agregación beta. Es decir, estas regiones son responsables de inducir la agregación de las moléculas, en particular, cuando se ponen en contacto con una proteína diana. En el presente caso, se explicará con más detalle las restricciones de secuencia de estas regiones.

20 Los estudios mutacionales de la cinética de agregación de proteínas de longitud completa revelaron correlaciones sencillas entre las propiedades de agregación y fisicoquímicas, tales como la propensión a formar β láminas, hidrofobia y carga. Esto propició el desarrollo de algoritmos informáticos que identifican regiones propensas a la agregación en la secuencia de aminoácidos de una proteína. Uno de estos es el algoritmo Zyggregator de Dobson et al. (Pawar et al., J Mol Biol 350: 379-392 (2005)), que identifica secuencias propensas a la agregación comparando la puntuación de propensión a la agregación de una secuencia de aminoácidos concreta con una propensión media calculada para una serie de secuencias de longitud similar. El algoritmo de mecánica estadística TANGO (Fernandez-Escamilla et al., Nat Biotechnol 22:1302-1306 (2004)), por otro lado, equilibra los parámetros fisicoquímicos mencionados anteriormente, complementados con la asunción de que un aminoácido se encuentra completamente enterrado en el estado agregado: esto significa que se desolvata completamente y se restringe entrópicamente. A partir de una secuencia inicial, TANGO genera una extensa muestra de fragmentos para los que se toman en consideración las propensiones estructurales que compiten, tales como la formación de hélices u horquillas. Después, se equilibran todos los fragmentos en una suma repartida global, que permite la identificación de regiones de secuencia que forman predominantemente agregados. El algoritmo TANGO tiene una precisión de más del 90% para un conjunto de 176 péptidos validados experimentalmente (Fernandez-Escamilla et al., Nat Biotechnol 22:1302-1306 (2004)). De manera importante, tanto el algoritmo Zyggregator como TANGO tienen buen rendimiento para péptidos y proteínas desnaturalizadas.

30 Para proteínas globulares, una molécula parcialmente plegada puede o bien volverse a plegar en su estado nativo o plegarse mal, dando un estado agregado. Como resultado, ambas reacciones se encuentran en competición y es esencial un conocimiento preciso de la cinética para predecir el resultado final en cuanto al plegamiento o mal plegamiento/agregación. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, es importante identificar secuencias que favorezcan cinéticamente la inducción de la agregación.

45 Más particularmente, las secuencias son secuencias de agregación beta no amiloides (en ocasiones citadas como secuencias de agregación beta amorfas). La agregación beta amiloide y no amiloide difiere en la estructura de orden mayor, en la cinética de agregación y en las secuencias de proteínas adecuadas para agregación (Rousseau et al., Current Opinion in Structural Biology 16:118-126, 2006). Comparando el espacio de secuencia de β agregación predicho por TANGO o Zyggregator con el espacio de secuencia de la amiloidosis (por ejemplo, procedentes de estudios experimentales, tales como Lopez de la Paz y Serrano, PNAS 101: 87-92, 2004) revela las similitudes, pero también diferentes interesantes entre ambos procesos. De hecho, ya que tanto la formación de amiloide como la β agregación cruzada amorfa requieren composiciones de aminoácidos que sean compatibles con una conformación de cadena β , cabe esperar un solapamiento en el espacio de secuencia. Sin embargo, la estructura de los agregados β cruzados amorfos no está claramente definida y parece que está caracterizada por un alto grado de flexibilidad. Por otro lado, la estructura de las fibras de amiloide es prácticamente cristalina. Como consecuencia, las preferencias de aminoácidos serán mucho más específicas de la posición en una fibra de amiloide que en los agregados β cruzados amorfos. Tomando en consideración el solapamiento en el espacio de secuencia, las realizaciones específicas prevén que la secuencia de agregación beta del al menos un resto Y_i sea adecuada al menos para la beta-agregación amorfa. De acuerdo con estas realizaciones, se prevé la beta agregación amorfa y además puede producirse o no la agregación de amiloide - esto no es crucial, en tanto que haya presencia de al menos beta agregación no amiloide.

60 Debido a sus requisitos conformacionales menos rigurosos, la β agregación es generalmente mucho más rápida que la amiloidosis, aunque también se ha observado una rápida amiloidosis. Ya que normalmente se observan agregados β como precursores en la vía de formación de fibra, la estabilidad de estos agregados precursores tendrá una fuerte influencia en la cinética de la amiloidosis. Las secuencias amilogenicas polares, observadas en las proteínas priónicas de levaduras, tendrán una propensión a la β agregación mucho menor y por lo tanto, serán mucho más favorables para la cinética de la amiloidosis. En resumen, la β agregación cruzada amorfa y la

amiloidosis pueden producirse en común y la estabilidad y la cinética de ambos procesos se determinará por el grado de cumplimiento de los requisitos estructurales de ambos procesos.

5 Por lo tanto, para favorecer cinéticamente la inducción de la agregación, es deseable usar no solo secuencias de beta agregación, sino también secuencias de beta agregación no amiloide. Por consiguiente, en realizaciones particulares, la al menos una región Y_i no es una secuencia de beta agregación amiloide. De esta manera, puede lograrse una rápida agregación de una proteína diana. En general, las secuencias altamente hidrofóbicas tienen una fuerte tendencia a formar β agregados cruzados amorfos, pero no forman fibras amiloides, debido a las restricciones estéricas. Por otro lado, las secuencias generalmente más polares tienen más probabilidades de formar fibras de amiloide. Entre estos dos extremos, probablemente se observará un amplio espectro de comportamientos. El algoritmo Tango, en particular, es muy adecuado para identificar secuencias de beta agregación con una alta propensión a la agregación y una baja propensión amiloide. De hecho, el algoritmo ofrece puntuaciones independientes para la propensión amiloide y la propensión a la beta agregación. El algoritmo Tango se ha descrito detalladamente en otras partes (en particular, en Fernandez-Escamilla et al., Nat. Biotechnol. 22:1302-1306, 2004, en concreto, la sección de Métodos en las páginas 1305 y 1306 se incorpora al presente documento específicamente por referencia. Véanse también las notas complementarias 1 y 2 del mismo artículo para detalles adicionales acerca de los métodos y los conjuntos de datos usados para la calibración y prueba del algoritmo TANGO; también puede encontrarse más información de base en el documento WO2007071789). Brevemente, para predecir regiones de auto-asociación de un péptido, TANGO calcula sencillamente la función de partición de la fase-espacio. Para estimar la tendencia a la agregación de una secuencia de aminoácidos particular, se hacen las siguientes suposiciones: (i) en un agregado de beta-lámina ordenado, la principal estructura secundaria es la cadena beta. (ii) las regiones implicadas en el proceso de agregación están completamente enterradas, con los consiguientes costes y ganancias de solvatación completa, entropía completa y optimización de su potencial de enlaces de H (es decir, el número de enlaces de H formados en el agregado está relacionado con el número de grupos donantes que están compensados por los aceptores. Un exceso de donantes o aceptores queda no satisfecho). (iii) las cargas complementarias en la ventana seleccionada establecen interacciones electrostáticas favorables y la carga neta general del péptido dentro pero también fuera de la ventana desfavorece la agregación. Puede tenerse acceso a TANGO a través de la *World Wide Web*.

Una alta puntuación de Tango en una serie de secuencia corresponde normalmente con una secuencia con alta (y cinéticamente favorable) propensión a la beta-agregación. Por lo tanto, el espacio de secuencia de "secuencias con alta puntuación de Tango" que no son demasiado polares y bastante hidrofóbicas define los restos Y_i ideales (o inductores de beta-agregación, agregación-nucleación).

35 Las mejores propiedades de agregación se obtienen cuando, en una molécula de acuerdo con la fórmula indicada anteriormente, cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E. (Aunque cabe mencionar que también pueden estar presentes 2 restos de R, K, D, E en caso de que sean uno un resto cargado positivamente y uno cargado negativamente). De acuerdo con realizaciones muy específicas, la región Y_i puede contener exactamente 2 restos cargados (seleccionados de entre R, K, D, E), en tanto que la carga neta de la región Y_i sea cero. Sin embargo, más particularmente, la región Y_i no contiene ningún resto cargado (o para esa materia, prolina).

45 Según este requisito, al menos un 50% de los aminoácidos en la serie Y_i son aminoácidos hidrofóbicos, es decir, son aminoácidos seleccionados de entre I, L, V, F, Y, W, H, M, T, K, A, C y G. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, al menos un 60% de los aminoácidos son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 2/3 de los aminoácidos son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 70% son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 75% son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 80% son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 85% son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 90% son aminoácidos hidrofóbicos, al menos un 95% son aminoácidos hidrofóbicos o incluso todos los aminoácidos son aminoácidos hidrofóbicos. Como alternativa, puede decirse que al menos 3 aminoácidos en la serie Y_i son aminoácidos hidrofóbicos, en particular, al menos 4 son aminoácidos hidrofóbicos, más particularmente, al menos 5 son aminoácidos hidrofóbicos, al menos 6 o incluso más de 6 son aminoácidos hidrofóbicos.

55 Algunos de los aminoácidos hidrofóbicos listados tienen mejores propiedades para inducir beta agregación (lo cual es el motivo por el que hay requisitos adicionales para la secuencia). De acuerdo con realizaciones particulares, los aminoácidos hidrofóbicos no abarcan G (ya que las cadenas laterales son demasiado pequeñas). De acuerdo con otras realizaciones particulares, los aminoácidos hidrofóbicos no abarcan C (ya que esto puede causar complicaciones como resultado de la posible formación de puentes disulfuro). De acuerdo con otras realizaciones particulares más, los aminoácidos hidrofóbicos no abarcan K (en vista de la carga positiva de este resto). De acuerdo con otras realizaciones particulares más, los aminoácidos hidrofóbicos no abarcan H (en vista de la carga parcialmente positiva de este resto). Por consiguiente, las realizaciones específicas prevén que los aminoácidos hidrofóbicos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A.

65 En cada serie Y_i , está presente al menos un resto seleccionado de entre I, L, V y F (resto alifático o F), más

particularmente, está presente más de uno de estos restos. En caso de que solo uno de los restos de la serie Y_i sea un resto de I, L, V o F, al menos un resto en la serie se selecciona de entre Y, W, M, T o A. Más particularmente, en estas realizaciones, al menos dos restos se seleccionan de entre Y, W, M, T o A. De acuerdo con realizaciones muy específicas, al menos dos restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y y W (es decir, de entre restos alifáticos o aromáticos no cargados). De acuerdo con otras realizaciones específicas, al menos tres restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, al menos cuatro restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A. De acuerdo con otras realizaciones específicas, al menos un 40% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, al menos un 50% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A. De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, al menos un 50% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F e Y (es decir, son restos alifáticos o F o Y). De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, al menos un 50% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V y F (es decir, son restos alifáticos o de F). De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales más, al menos un 50% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre restos alifáticos, es decir, se seleccionan de entre I, L y V. De acuerdo con realizaciones específicas alternativas, al menos un 60% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A. De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, al menos un 60% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V, F e Y (es decir, son restos alifáticos o F o Y). De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, al menos un 60% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V y F (es decir, son restos alifáticos o de F). De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales más, al menos un 60% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre restos alifáticos, es decir, se seleccionan de entre I, L y V. De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, al menos dos tercios de los restos se seleccionan de entre I, L, V, F, Y, W, M, T y A; o se seleccionan particularmente de entre I, L, V, F e Y_i o más particularmente, se seleccionan de entre I, L, V y F (es decir, son restos alifáticos o de F); o al menos dos tercios de los restos en la serie Y_i son restos alifáticos (es decir, seleccionados de entre I, L y V). Como alternativa, puede decirse que al menos 3 aminoácidos en la serie Y_i se seleccionan de entre los restos anteriores, en particular, al menos 4 aminoácidos, más en particular, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 o incluso más de 6 aminoácidos. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, al menos 3 aminoácidos en la serie Y_i se seleccionan de entre I, L, V o F, en particular, al menos 4 aminoácidos son restos alifáticos o F, más en particular, al menos 5 aminoácidos son restos de I, L, V o F. De acuerdo con otras realizaciones adicionales más, al menos 3 aminoácidos en la serie Y_i son restos alifáticos, al menos 4 aminoácidos en la serie Y_i son restos alifáticos o al menos 5 aminoácidos en la serie Y_i son restos alifáticos.

De acuerdo con otras realizaciones específicas, el número de ciertos restos alifáticos está limitado en la serie Y_i . Por ejemplo, en una (es decir, al menos una, hasta cada una) serie Y_i , no hay más de un resto de C. De acuerdo con otras realizaciones específicas, no hay más de un resto de H en una serie Y_i . De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de G en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de G. De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de T en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de T. De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de M en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de M. De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de W en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de W. De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de A en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de A. De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de Y en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de Y. Obsérvese que, al igual que para otras realizaciones, estas realizaciones no son excluyentes. Es decir, puede aplicarse una combinación de 2 o más de estas restricciones a una serie Y_i dada.

Huelga decir que cuando hay presente no más de un cierto número de restos particulares, siempre es posible que ninguno de estos restos particulares esté presente.

Los aminoácidos cargados, así como prolina, reducen normalmente el potencial de beta agregación de una serie Y_i dada. Aunque normalmente puede tolerarse un resto cargado o de prolina o dos aminoácidos cargados en caso de que tengan cargas opuestas, de acuerdo con realizaciones particulares, la serie Y_i carece de restos de P, R, K, D y E. Como alternativa, la serie contiene no más de un resto de P, R, K, D o E (es decir, no más de un resto seleccionado de entre P, R, K, D y E). De acuerdo con realizaciones muy específicas, la serie puede contener un resto de K, pero ningún resto de P, R, D o E (en vista de la naturaleza hidrófoba de los restos de lisina). De acuerdo con realizaciones particulares, no hay restos de P, R, K, D, E presentes en la región Y_i . De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, no hay restos de P, R, K, D, E o H presentes en la serie Y_i . Esto se debe a que los restos de H pueden estar parcialmente cargados positivamente y generalmente se prefieren regiones Y_i neutras.

Se prevé particularmente que al menos una región (y hasta cada una de las regiones) Y_i porte una carga máxima de 1 y más particularmente, no porta una carga. Aún más particularmente, se prevé que el número de restos cargados no sea mayor de uno, lo más particularmente, no hay restos cargados presentes en al menos una (y particularmente en cada una de las regiones) Y_i .

De acuerdo con otras realizaciones no excluyentes, la serie Y_i , incluso cuando no contiene restos cargados, tampoco

contiene más de un 75% de restos polares no cargados, es decir, restos seleccionados de entre Y, W, T, Q, S, N y H (C no se considera un resto polar en este caso y H no se considera un resto cargado). Más particularmente, no contiene más de un 67% de restos polares no cargados, aún más particularmente, no contiene más de un 60% de restos polares no cargados (o incluso menos de un 60% de restos polares no cargados). En otras palabras, incluso si las series tienen gran cantidad de restos de Y, W o T (que son polares, no cargados e hidrofóbicos), siguen necesitando que haya suficientes restos apolares. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la serie Y_i no contiene más de un 50% de restos polares no cargados. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, la serie Y_i no contiene más de un 40% de restos polares no cargados. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, la serie Y_i no contiene más de un tercio de restos polares no cargados. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, la serie Y_i no contiene más de un 25% de restos polares no cargados.

Puede haber restos no hidrofóbicos, polares no cargados (es decir, S, N y Q) en una región Y_i , pero su número es preferentemente limitado. De acuerdo con otras realizaciones específicas, no hay más de un resto de Q. De acuerdo con otras realizaciones específicas, no hay más de un resto de N. De acuerdo con realizaciones alternativas, no hay presente más de uno o dos restos de S en la serie Y_i , en particular, no hay presente más de un resto de S.

Puede haber restos no aromáticos, polares no cargados (es decir, S, N, T y Q) en una región Y_i , pero se prevé particularmente que no sean adyacentes entre sí (es decir, no hay presentes 2 restos no aromáticos, polares no cargados contiguos).

Tal como resulta evidente a partir de lo anterior, puede ser beneficioso limitar la presencia de restos específicos por motivos particulares. También puede ser beneficioso limitar la suma de grupos de restos. De acuerdo con realizaciones particulares, los restos en una serie Y_i no contienen más de un 60% de restos seleccionados de entre C, M, N, Q y W. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, los restos en una serie Y_i no contienen más de un 50% de restos seleccionados de entre C, M, N, Q y W. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, los restos en una serie Y_i no contienen más de un 40% de restos seleccionados de entre C, M, N, Q y W. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales más, los restos en una serie Y_i no contienen más de un tercio de los restos seleccionados de entre C, M, N, Q y W. De acuerdo con realizaciones particulares, los restos en una serie Y_i no contienen más de un 25% de restos seleccionados de entre C, M, N, Q y W.

De acuerdo con otras realizaciones particulares más, la serie Y_i , incluso cuando no contiene restos cargados o prolina, también contiene menos de un 75% de restos pequeños distintos de V (es decir, seleccionados de entre A, T, C, G, S, N), más particularmente, menos de un 67% de restos pequeños distintos de V, aún más particularmente, menos de un 60% de restos pequeños distintos de V. En otras palabras, incluso si las series tienen gran cantidad de restos de T y A, siguen necesitando que haya suficientes restos hidrofóbicos grandes. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no más de un 50% (pero incluyendo un 50) de los restos en la región Y_i son restos pequeños distintos de V. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no más de un 40% de los restos en la región Y_i son restos pequeños distintos de V. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no más de un tercio (pero incluyendo un 33,33...%) de los restos en la región Y_i son restos pequeños distintos de V. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no más de un 25% de los restos en la región Y_i son restos pequeños distintos de V. En particular, se prevé que el número de restos diminutos esté limitado en la serie Y_i . Aunque puede considerarse que C es un resto diminuto cuando no está implicado en la formación de puentes disulfuro, se prevé particularmente que los restos diminutos sean restos de A, G y S. De acuerdo con realizaciones particulares, no más de un 50% de los restos en la serie Y_i son restos de A, G y S. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, no más de un 40% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre A, G y S. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no más de un tercio de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre A, G y S. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no más de un 25% de los restos en la serie Y_i se seleccionan de entre restos de A, G y S.

Como alternativa o además, el número de restos diminutos puede ser limitado. Esto es particularmente cierto para los restos no polares de A y G. De acuerdo con realizaciones particulares, el número total de restos de A y G en una serie Y_i es de no más de 4. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, el número total de restos de A y G en una serie Y_i es de no más de 3. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, la suma total de restos de A y G en una serie Y_i es de no más de 2. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, la suma total de restos de A y G en una serie Y_i es de no más de uno.

Para lograr agregación específica de secuencia, se prevé que los restos Y_i seleccionados para inducir la agregación tengan una suficiente complejidad de secuencia. Por esto, se entiende que las secuencias que tienen exceso de un aminoácido particular no son particularmente adecuadas para la agregación específica de secuencia. Por ejemplo, una serie de polileucina normalmente no logrará una agregación específica de secuencia (a pesar de que es suficientemente hidrofóbica y podría agregarse). Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones particulares, no hay más de 3 aminoácidos contiguos idénticos presentes en una serie Y_i . De acuerdo con otras realizaciones aún más particulares, no hay más de 2 aminoácidos contiguos idénticos presentes en una serie Y_i . De acuerdo con realizaciones específicas, solo puede haber un aminoácido alifático adyacente al mismo aminoácido en una serie Y_i . Es decir, de acuerdo con estas realizaciones, solo puede haber 2 aminoácidos I, L o V contiguos (consecutivos) en una serie Y_i . De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, no puede haber más de 3 aminoácidos alifáticos

idénticos consecutivos en una región Y_i . De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, no puede haber más de 2 aminoácidos alifáticos idénticos consecutivos en una región Y_i . Por lo tanto, de acuerdo con estas realizaciones, solo puede haber dos aminoácidos alifáticos idénticos adyacentes entre sí en una serie Y_i .

De acuerdo con realizaciones alternativas, pero no excluyentes, ningún aminoácido alifático individual está presente más de 3 veces en una serie Y_i (es decir, el número de aminoácidos idénticos para un resto no alifático está limitado a 3 en una serie Y_i). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, ningún aminoácido no alifático individual está presente más de 2 veces en una serie Y_i . De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, ningún aminoácido no alifático individual está presente más de 1 vez en una serie Y_i . De acuerdo con realizaciones alternativas, ningún aminoácido alifático individual está presente más de 3 veces en una serie Y_i . De acuerdo con realizaciones adicionales, ningún aminoácido alifático individual está presente más de 2 veces en una serie Y_i . De acuerdo con otras realizaciones particulares, ningún aminoácido particular forma más del 50% de los restos en una serie Y_i (es decir, no más de la mitad de la serie Y_i está compuesta por un aminoácido particular). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, ningún aminoácido individual forma más del 40% de los restos en una serie Y_i . De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, ningún aminoácido forma más de un tercio de los restos en una serie Y_i .

De acuerdo con otras realizaciones particulares más, la serie Y_i no está compuesta de o incluso no contiene, repeticiones de dos aminoácidos. Por repeticiones de dos aminoácidos se entiende tres o más o incluso dos o más, repeticiones de dos restos no idénticos. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la serie Y_i no está compuesta de o incluso no contiene, repeticiones de tres aminoácidos. Por repeticiones de tres aminoácidos se entiende tres o más o incluso dos o más, repeticiones de tres restos, de los cuales al menos dos no son idénticos. A modo de ejemplo, aunque la isoleucina y el triptófano son perfectamente aceptables en una región Y_i , tampoco será particularmente adecuada una región Y_i que esté formada exclusivamente por repeticiones de IW o IWW para la agregación específica de secuencia. Obsérvese que la agregación específica de secuencia no se descarta para cualquiera de estas secuencias, pero se prefiere el uso de secuencias más complejas para lograr la agregación específica.

La longitud de la serie agregante normalmente está compensada entre la especificidad deseada y el coste y la facilidad de síntesis de secuencias hidrófobas. Tal como se muestra en la figura 2, no es necesario que las secuencias sean muy largas para que sean únicas dentro del genoma de un organismo dado. Por ejemplo, un 60% de las secuencias con una longitud de 5 aminoácidos que están presentes en las proteínas son únicas en seres humanos (es decir, solo el 40% de dichas secuencias aparecen más de una vez). Para organismos con genomas menos complejos, tales como *E. coli*, más de un 80% de las secuencias de 5 aminoácidos codificadas por el genoma son únicas. A partir de la figura, puede observarse que el aumento de la especificidad se nivela, por lo que rara vez es necesario usar secuencias muy largas para lograr especificidad. La memoria descriptiva describe la región Y_i que contiene al menos 5 restos. De acuerdo con realizaciones particulares, la región Y_i contiene al menos 6 restos. De acuerdo con otras realizaciones particulares no excluyentes, la región Y_i contiene como máximo 12 restos. De acuerdo con otras realizaciones adicionales, la región Y_i contiene como máximo 11 restos. De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, la región Y_i contiene como máximo 10 restos.

En algunos casos, puede ser deseable trabajar con secuencias que no sean únicas en un organismo dado. Este es el caso, por ejemplo, en aplicaciones dirigidas contra patógenos (no propios), donde es más importante la inhibición del crecimiento y/o la eliminación del organismo patógeno que el uso como diana de solamente una proteína específica. Tal como puede verse a partir de la figura, las series beta agregantes serán normalmente más cortas en estas realizaciones, de tal forma que puede dirigirse a más proteínas.

Para evitar una extensión no necesaria de la serie Y_i , de acuerdo con realizaciones particulares, se prevé que el resto N y/o C-terminal de la serie Y_i sea un resto que sea particularmente susceptible a la β -agregación, en particular, un resto seleccionado de entre I, L, V, F, Y, W, A, M y T. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, el resto N y/o C-terminal (es decir, al menos uno seleccionado de entre el resto N y C-terminal o el primer y/o el último resto) de una serie Y_i se selecciona de entre I, L, V, F, Y y W.

De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, el resto N y/o C-terminal de una serie Y_i se selecciona de entre I, L, V, F e Y. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, el resto N y/o C-terminal de una serie Y_i se selecciona de entre I, L, V y F. De acuerdo con otras realizaciones particulares adicionales más, el resto N y/o C-terminal de una serie Y_i se selecciona de entre I, L y V (es decir, es un resto alifático). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, estas limitaciones se aplican al resto tanto N como C-terminal de la serie Y_i .

Ya que un objetivo es proporcionar moléculas que sean capaces de regular a la baja de manera específica a proteínas, en particular, de una manera específica de secuencia, se describen particularmente aquellas moléculas donde al menos una de Y_i en la molécula es una serie de 4 a 17 (en particular, de 4 a 16 o de 4 a 15) o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, una serie de 6 a 16, aminoácidos que es idéntica a una serie contigua de origen natural en una proteína. Puede decirse que esta serie contigua en la proteína es la región afín del resto Y_i . De acuerdo con aspectos específicos adicionales, esta es la causa para más de un Y_i en la molécula, en particular, para dos Y_i o al menos dos Y_i en la molécula, lo más particularmente, para todos los Y_i en la molécula. De acuerdo con realizaciones muy específicas, sin embargo, Y_i no es idéntico a una serie de origen natural en una proteína. Esto se prevé, por ejemplo, para proteínas con un marcador artificial, donde Y_i es idéntica a una secuencia en el marcador artificial. Dichos marcadores pueden ser útiles, ya que el diseño de secuencias artificiales permite más

libertad a la hora de determinar la propensión a la agregación de la secuencia. De esta manera, se hace factible dirigirse a proteínas que no tienen una región de agregación central evidente.

5 Ya que al menos una serie Y_i confiere especificidad, se prevé particularmente en algunas realizaciones que esta serie no corresponda a (una parte de) una serie repetitiva de uno o dos aminoácidos (por ejemplo, una serie de polileucina o de leucinas y valinas alternas). Este es el caso, particularmente, para aquellas realizaciones donde $n=1$. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la serie Y_i contiene al menos 3 aminoácidos diferentes en su secuencia.

10 Sin embargo, de acuerdo con realizaciones particulares, al menos una Y_i es idéntica a una serie contigua de origen natural en una proteína, mientras que al menos una Y_i distinta en la misma molécula no es idéntica a una serie en una proteína en el organismo en cuyo genoma se codifica la proteína diana. La última Y_i es normalmente una secuencia "potenciadora", es decir, una secuencia que se sabe que tiene una elevada tendencia a la agregación. Esta secuencia puede mejorar la cinética de agregación o asegurar que se produzca/se inicie la agregación de la proteína diana a concentraciones menores. Dichas secuencias pueden ser sintéticas o pueden proceder de una secuencia (es decir, idéntica o altamente similar a una serie de secuencia) presente en otro organismo/especie.

20 En caso de que se prevea el uso como diana específica de una proteína, la al menos una serie de 4 a 15 o de acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, la al menos una serie de 6 a 16, aminoácidos contiguos de origen natural en una proteína debe ser única para dicha proteína en el organismo (o especie) en cuyo genoma se codifica la proteína (es decir, debe ser única en el proteoma de dicho organismo/especie), para asegurarse de que, de hecho, solo se usa como diana una proteína en el organismo. Esta unicidad normalmente solo es necesaria en un genoma específico (es decir, el genoma del organismo en donde está presente la proteína que se va a regular a la baja). De hecho, en caso de que la secuencia esté presente en otro organismo al que no se administra el interferidor (o en el que este no puede alcanzar su diana), esto carece de importancia. Esto se aplica también en los casos donde carece de importancia que se sea diana una proteína en un organismo diferente, normalmente un microorganismo u organismo patógeno.

30 En ocasiones, en particular cuando la diana son patógenos o se tratan o estabilizan infecciones, se prevé que puede usarse como diana más de una proteína. En estos casos, la secuencia de proteína no es necesariamente única en el genoma del organismo. Sin embargo, puede seguir siendo única para el organismo o especie. Esto puede preverse cuando las moléculas descritas en el presente documento se administren a más de una especie diferente de manera simultánea (por ejemplo, una mezcla de microorganismos), mientras que solo se necesita regular a la baja una especie de proteína (por ejemplo, para una especie patógena diana, mientras que no se interfiere con organismos no patógenos o beneficiosos). Obsérvese que esto también se aplica, por ejemplo, cuando se administra, por ejemplo, una molécula interferidora que usa como diana una proteína antimicrobiana a un sujeto humano: en dichos casos, la secuencia del resto Y_i no debe ser idéntica a la de una proteína humana o al menos no idéntica a una proteína humana con la que pueda entrar en contacto el interferidor). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la secuencia es única para la proteína y única para el organismo/especie.

40 En lugar de especie, las consideraciones anteriores también se aplican a un género, una familia, un orden o una clase de organismos, aunque la probabilidad de conservación de secuencia y de hallar una secuencia única, se reduce a medida que aumenta la clasificación taxonómica.

45 Los al menos dos restos Y_i presentes (en realizaciones donde n es al menos dos) pueden ser idénticos (es decir, se dirigen a las mismas proteínas, en ocasiones citados en el presente documento como "péptidos de repetición en tándem"), pueden ser diferentes pero estar presentes en la misma proteína (se dirigen a la misma proteína de diferentes maneras, es decir, interferidores "biagretópicos", en donde se usan como diana dos "agregados" o regiones de agregación), pueden ser diferentes y estar presentes en diferentes proteínas (para usar como diana más de una proteína en un organismo (es decir, auténticos interferidores específicos) o para dirigirse a proteínas en diferentes organismos, en caso de que el interferidor se administre o se ponga en contacto con más de un (micro)organismo). Obsérvese que la "administración a un organismo" puede ser administración indirecta. Por ejemplo, en el caso de patógenos, se prevé que el interferidor se administre al organismo hospedador (normalmente un sujeto, ya sea un sujeto vegetal o animal) para que se dirija al organismo patógeno. Ya que en estos casos la molécula interferidora contendrá al menos una secuencia de agregación presente en el organismo patógeno y tiene como objetivo agregar la proteína en la que está presente esta secuencia, será evidente para el experto en la materia que esto ha de interpretarse como "administrar la molécula al organismo patógeno" - a este respecto, lo que cuenta es la puesta en contacto (alcanzar la diana).

60 En general, para lograr un direccionamiento específico, se prevé una coincidencia perfecta entre la región Y_i y la serie de secuencia en la proteína de interés. Sin embargo, en algunos casos, se prevé que puedan usarse secuencias no idénticas, pero estrechamente relacionadas, es decir, secuencias que tienen una o dos sustituciones. A fin de mantener la especificidad, la memoria descriptiva describe que para sustituciones no conservativas, para las series Y_i de menos de 6 aminoácidos, solo se tolere una diferencia de aminoácidos. Para secuencias de al menos 6 aminoácidos (en particular, al menos 7 o al menos 8 aminoácidos), pueden sustituirse uno o dos aminoácidos. De acuerdo con aspectos o realizaciones de la invención, Y_i es una serie idéntica a o que difiere en no más de una

sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que aparece en una proteína de interés. Como alternativa, la memoria descriptiva describe que la identidad de secuencia entre la Y_i y la serie agregante en la proteína de interés es de al menos el 70%, al menos el 75%, en particular, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o incluso mayor. En caso de sustituciones conservativas, la similitud de secuencia entre la Y_i y la serie agregante en la proteína de interés es de al menos el 70%, al menos el 75%, en particular, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o incluso mayor.

Tal como será evidente para un experto en la materia, la realización de una sustitución (en particular, no conservativa) puede dar como resultado una especificidad alterada (es decir, hacer idéntica la serie a una de otra proteína en el organismo o a una de una proteína en otro organismo con el que el interferidor puede entrar en contacto), por lo que debe comprobarse si esto sucede en caso de que no se desee un direccionamiento alterado. (En algunos casos, puede ser deseable dirigirse de manera específica a más de una proteína, véase también más adelante).

Una sustitución conservativa es la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos cuyas cadenas laterales tienen propiedades bioquímicas similares (por ejemplo, son alifáticos, son aromáticos, tienen carga positiva, ...) tal como es de sobra conocido por un experto en la materia. Por lo tanto, una sustitución no conservativa es la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos cuyas cadenas laterales no tengan propiedades bioquímicas similares (por ejemplo, reemplazo de un resto hidrofóbico por uno polar). Las sustituciones conservativas normalmente proporcionarán secuencias que dejan de ser idénticas, pero que siguen siendo altamente similares.

Los motivos para introducir una sustitución pueden variar. De acuerdo con realizaciones particulares, la sustitución es con un resto constitutivo, en particular, con uno seleccionado de entre R, K, E, D, P, N, S, A, H, G, Q, más particularmente seleccionado de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre restos de R, K y P. Esto puede preverse para mejorar la solubilidad o reducir la auto-agregación (mediante la "ruptura" del potencial de formación de beta-lámina de la región Y_i ; hidrofoba) o para reducir la especificidad a la vez que se mantiene la agregación (esto se ilustra en el ejemplo 3). Aunque dichas sustituciones reducen generalmente la especificidad, en algunas realizaciones, puede preverse que proporcione un más fácil acceso a la secuencia inductora de la agregación (mediante la "apertura" de la región hidrofoba). Este es el caso, en particular, para realizaciones donde se favorece la agregación frente a la especificidad (por ejemplo, en aplicaciones antimicrobianas).

De acuerdo con realizaciones alternativas, la sustitución es una sustitución conservativa. Esto se prevé cuando se prevé regular a la baja una familia de proteínas y las proteínas comparten un motivo de secuencia conservado, pero no idéntico. En dichos casos, puede lograrse la agregación de estas proteínas estrechamente relacionadas usando un motivo de secuencia consenso (es decir, una secuencia similar pero ni idéntica, donde "similar" se usa en el contexto del alineamiento de secuencias). Sin embargo, es posible que la agregación sea menos eficaz cuando la coincidencia de secuencias no sea del 100%.

Otro motivo para considerar la sustitución es para aumentar la propensión inherente a la agregación de la secuencia. Por ejemplo, se puede considerar el reemplazo de un resto particular por un resto con una mayor propensión a beta-láminas o un mayor potencial de agregación. Esta no es necesariamente una sustitución conservativa. Los métodos para determinar la propensión a beta-láminas o el potencial de agregación se conocen bien en la técnica. A modo de ejemplo, la propensión a formar beta-láminas de un resto particular puede determinarse tomando en consideración los parámetros de Chou-Fasman (Chen et al., BMC Bioinformatics 7 (Supl 4): S14, 2006). Se puede reemplazar uno o más restos con una puntuación $P(\text{b-lámina})$ menor de 100 por restos con una puntuación $P(\text{b-lámina}) > 100$. Los restos con alta puntuación de beta-lámina en el método de Chou-Fasman son (en orden descendente): valina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, triptófano, leucina, treonina, cisteína, glutamina y metionina. En particular, se prevé la sustitución con valina o isoleucina para aumentar el potencial de formación de beta-láminas. Obviamente, siempre ha de comprobarse la especificidad y de nuevo en este caso, se prevé particularmente la sustitución para aplicaciones donde se favorece la agregación frente a la especificidad.

En caso de que el resto Y_i necesite ser idéntico a una serie que se produzca en una proteína, las secuencias inductoras de la agregación específicas pueden identificarse a la vista de la secuencia de proteína (usando las orientaciones anteriores) o usando algoritmos específicos para identificar series de secuencia que cumplen estos requisitos. Usando el mismo u otros métodos o algoritmos, puede comprobarse si la secuencia también se produce en otras proteínas (o está codificada en genomas de otros organismos).

Una forma particularmente fácil de identificar dichas secuencias en una proteína es mediante el uso en primer lugar de un algoritmo de predicción de la beta-agregación (preferentemente uno que tenga en cuenta parámetros biofísicos) y seleccionando las secuencias más adecuadas basándose en las limitaciones de secuencia anteriores. Como ejemplos de dichos algoritmos ya se citaron Tango y Zygggregator, pero se han descrito en la técnica muchos más, incluyendo, pero sin limitación, los descritos por Bryan et al., PLoS Comput Biol. 5(3):e1000333, 2009; Cafilish, Curr Opin Chem Biol. 10(5):437-44, 2006; Conchillo-Sole et al., BMC Bioinformatics 8:65, 2007; Galzitskaya et al., PLoS Comput Biol. 29;2(12):e177, 2006; Goldschmidt et al., PNAS 107(8):3487-92, 2010; Maurer-Stroh et al., Nat Methods 7(3):237-42, 2010; Rojas Quijano et al., Biochemistry 45(14):4638-52, 2006; Saiki et al., Biochem Biophys Res Commun 343(4):1262-71, 2006; Sanchez de Groot et al., BMC Struct Biol 5:18, 2005; Tartaglia et al., Protein

Sci. 14(10):2723-34, 2005; Tartaglia et al., J Mol Biol. 380(2):425-36, 2008; Thompson et al., PNAS 103(11):4074-8, 2006; Trovato et al., Protein Eng Des Sel. 20(10):521-3, 2007; Yoon y Welsh, Protein Sci. 13(8):2149-60, 2004; Zibae et al., Protein Sci. 16(5):906-18, 2007. Obsérvese que muchos de estos están implicados principalmente en secuencias de agregación de amiloide y no solo con la beta-agregación amorfa. Tal como se ha explicado anteriormente, el espacio de secuencia de ambas formas de agregación se solapa (Rousseau et al., Current Opinion in Structural Biology 16:118-126, 2006) y se prevén ambas formas de agregación, en tanto que la cinética y las condiciones de la reacción favorezcan la agregación de la proteína de interés. Sin embargo, normalmente, dichos algoritmos también pueden identificar series polares (tales como aquellas presentes en proteínas priónicas de levadura) que no satisfacen las limitaciones de secuencia de Y_i definidas en el presente documento.

5

10

Restos X_{2i-1} y X_{2i} : Restos constitutivos

En las moléculas interferidoras descritas en el presente documento, las secuencias inductoras de agregación están flanqueadas en ambos lados por 1 a 4 aminoácidos específicos (los restos X_i) que tienen un bajo potencial de beta-agregación. Estos se citan en ocasiones como restos constitutivos (Pedersen et al., J Mol Biol 341: 575-588, 2004), y son esenciales para prevenir la auto-agregación de las moléculas interferidoras (en particular, antes de entrar en contacto con una proteína diana).

En el estado nativo de las proteínas, la agregación normalmente se contiene u opone mediante restos cargados de origen natural pero también, por ejemplo, mediante prolinas y glicinas en los flancos de los segmento de secuencia de agregación. Estos actúan de manera eficaz como restos constitutivos, es decir, restos que no necesariamente estabilizan el estado nativo, pero que bloquean la formación de estados mal plegados o agregados no deseados mediante, por ejemplo, choques estéricos o electrostáticos. También se ha comunicado en varias ocasiones que la introducción de restos cargados, prolinas o glicinas en secuencias propensas a la agregación reduce la agregación. Las propiedades de oposición a la agregación de la prolina y la glicina se deben principalmente a sus propiedades de ruptura de la estructura. También son muy eficaces restos con carga idéntica para oponerse a la agregación, debido a la enorme fuerza de repulsión generada tras el auto-ensamblaje. Curiosamente, en la naturaleza, se prefieren arginina y lisina frente a glutamato y aspartato en los flancos que las secuencias con fuerte agregación (Rousseau et al., J Mol Biol 355:1037-1047, 2006). El motivo para esta preferencia puede ser que, además de la carga, la arginina y la lisina también tienen una entropía conformacional mucho mayor, haciendo que sea muy costoso inmovilizarlas en agregados densamente empaquetados.

En la solicitud WO2007071789, se afirmó que dichos restos constitutivos reducen la propensión a la agregación. Para optimizar la co-agregación de los interferidores con una proteína diana dada, la región de auto-asociación de la proteína diana que se incluye en el interferidor puede mutarse, de tal forma que los restos constitutivos se reemplazan por restos promotores de la agregación. En otras palabras, se consideró no deseable la presencia de restos constitutivos.

Ahora, se ha demostrado sorprendentemente que, para las regiones de fuerte beta-agregación que forman los restos Y_i , flanquearlos con restos constitutivos (es decir, los dos restos X numerados) de hecho reduce su propensión a la auto-agregación, pero no interfiere sustancialmente con su capacidad para inducir la agregación de la proteína de longitud completa. Por un lado, es sorprendente que a pesar de la alta hidrofobia y la propensión intrínseca a la agregación, estas moléculas se mantienen en solución; por otro, el efecto de los restos constitutivos proporcionados en las moléculas no impide la co-agregación de la proteína (de longitud completa) con la molécula. Esta combinación única de características hace que las moléculas proporcionadas en el presente documento sean particularmente adecuadas para lograr la agregación inducida de proteínas.

Estos restos constitutivos se seleccionan en particular de entre restos de R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q. También podrían usarse restos de alanina, pero ya que estos también pueden estar en los restos Y_i , se prevé particularmente que un resto X , tal como se usa en el presente documento, no esté solo compuesto de restos de A. De manera más específica, se prevé que solo se usen restos de A como restos constitutivos en caso de que otra parte del resto X sea al menos un resto seleccionado de entre R, K, P, D o E.

Obsérvese que, con la excepción de G y P, estos son todos restos polares. Los restos de G y P son buenos restos constitutivos debido a su estructura específica de la cadena lateral (prolina) o a la ausencia de la misma (glicina). Aunque S, H, N y Q son restos polares, pueden tolerarse en una serie beta-agregante en bajos números (véase lo anterior). Se aplica una consideración similar para los restos de G.

De acuerdo con realizaciones particulares, los restos en los restos flanqueantes X son restos que no están presentes en el resto Y_i entre estos restos flanqueantes.

En estos casos, los restos X son normalmente de 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D, P y H. Más en particular, son de 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P. Aún más en particular, se seleccionan de entre R, D y P. Obsérvese que P se mantiene en esta selección de restos constitutivos ya que es un rompedor muy eficaz de la estructura de beta-lámina. Sin embargo, de acuerdo con realizaciones particulares, especialmente donde n es 1, no se prevé que P sea un resto constitutivo.

Normalmente, son suficientes uno o dos aminoácidos para romper la beta-lámina y mantener las moléculas en solución. Los restos X más cortos son beneficiosos en términos de facilidad y coste de síntesis, mientras que son eficaces en su función "constitutiva", es decir, en demarcar y/o presentar los restos Y hidrofóbicos. Por consiguiente, en algunas realizaciones particulares, cada X_{2i-1} y X_{2i} es de 1 o 2 aminoácidos (que pueden seleccionarse independientemente entre sí).

De manera similar, los péptidos que están limitados en cuanto a su carga pueden facilitar la interacción con proteínas de interés: mientras que siguen proporcionado la posibilidad de enlaces de H, se reduce el riesgo de repulsión electrostática. Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones alternativas, pero no excluyentes, cada X_{2i-1} y X_{2i} tiene una carga total de no más de 2. Como alternativa, el número total de aminoácidos en ambos restos X es de 5 o menor, particularmente de 4 o menor. Algunas realizaciones alternativas prevén que la carga total de ambos restos X que rodean a la región Y hidrofoba sea menor de 5, particularmente de 4 o menor. Las realizaciones en este párrafo se prevén más particularmente para moléculas donde n es 1 o moléculas donde n es dos.

Ya que se prevé en particular que los restos Y_i no contengan restos cargados, la carga total de las moléculas normalmente no será mayor de 5 cuando n es 1 y no mayor de 10 cuando n es 2. Para moléculas donde n es 2, se prevé particularmente que la carga total de la molécula sea entre 2 y 10, más en particular entre 2 y 8, más en particular entre 4 y 8, aún más en particular, entre 2 y 6 (por ejemplo, 3, 4, 5), entre 4 y 6, tal como 4, 5 o 6. Se prevé particularmente que la carga esté distribuida de una manera más o menos uniforme por toda la molécula, es decir, todos los restos X tienen una carga similar (dicho de otro modo: la diferencia de carga entre los restos X contenidos en una molécula es, en particular, de no más de uno). De acuerdo con realizaciones específicas, la molécula no es neutra, es decir, contiene cierta carga. Esto se debe a que los restos cargados normalmente ayudarán a obtener especificidad, es decir, a hacer que el resto Y_i de las moléculas interactúe solamente con series de polipéptido casi completamente idénticas o completamente idénticas. Además, la carga puede ayudar a prevenir la auto-asociación y la agregación prematura de las moléculas (es decir, sin co-agregación de la diana). Por lo tanto, en realizaciones específicas, al menos uno y hasta cada uno de los restos X numerados tiene una carga de 1 o 2. Para que sea económico, los restos X están formados predominantemente o exclusivamente de restos con carga idéntica dentro del resto. Es posible que un resto X_{2i-1} tenga una carga con signo distinto a la del resto X_{2i} correspondiente.

De acuerdo con realizaciones particulares, los X_{2i-1} y X_{2i} que rodean a una región Y_i son idénticos. De acuerdo con realizaciones adicionales, cada uno de los X_{2i-1} en la molécula es idéntico a cada uno de los X_{2i} . De acuerdo con otras realizaciones adicionales, todos los X_{2i-1} y X_{2i} en la molécula son idénticos. De acuerdo con otras realizaciones específicas, los restos de al menos uno, y en particular todos los X_{2i-1} imitan a modo de espejo el orden de secuencia de los restos en el X_{2i} correspondiente. Es decir, en caso de que los restos constitutivos de X_{2i-1} sean, por ejemplo, N-P (es decir, un aminoácido de asparagina N-terminal de un aminoácido de prolina), los restos en X_{2i} son P-N (la asparagina C-terminal del resto de prolina).

De acuerdo con realizaciones alternativas, la carga de al menos uno y en particular de todos, X_{2i-1} tiene el mismo signo que su X_{2i} correspondiente. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, la carga de al menos uno y en particular de todos, X_{2i-1} es idéntica a la del X_{2i} correspondiente. Los restos con carga idéntica se oponen con más fuerza a la agregación mediante auto-asociación. De acuerdo con otras realizaciones, la carga de todos los restos X en la molécula es neutra o tiene el mismo signo. Esto puede ayudar a prevenir la atracción electrostática entre las moléculas.

De acuerdo con algunas realizaciones muy específicas, al menos una parte de al menos un resto X que flanquea a la región Y_i también está presente en la proteína de interés. De hecho, las secuencias hidrófobas en las proteínas normalmente están flanqueadas por restos constitutivos, para prevenir la agregación. De acuerdo con realizaciones específicas donde al menos una Y_i es idéntica a una secuencia de origen natural en una proteína, al menos un resto constitutivo que flanquea a la Y_i en los restos X de las moléculas es idéntico a un resto constitutivo que se produce en la proteína. Este es el caso particularmente en los casos donde la secuencia Y_i corresponde a la secuencia completa entre los restos constitutivos en la proteína, de tal forma que la secuencia de la molécula corresponde a la secuencia de la proteína para al menos una serie Y_i y al menos parte de al menos una serie X adyacente a la serie Y_i . Esto se aplica también, en particular, para proteínas donde los restos constitutivos naturalmente flanqueantes no son tan fuertes, es decir, son restos que también pueden formar parte de una serie Y_i , tales como, por ejemplo, N o S. Por lo tanto, la secuencia de la molécula y la proteína de interés es correspondiente a lo largo de una región contigua de al menos un aminoácido más largo que la serie Y_i de la molécula (es decir, al menos un resto constitutivo flanqueante de la secuencia agregante en la proteína está incluido en la molécula).

De acuerdo con realizaciones particulares alternativas, se prevé que los restos constitutivos faciliten o estabilicen la interacción del resto Y_i con su región afin en la proteína. Este puede ser el caso cuando los restos que flanquean la región de agregación en la proteína (en el lado N y/o C-terminal) portan una carga. Para reducir las probabilidades de repulsión por cargas similares y de este modo maximizar las probabilidades de interacción, la carga de los restos constitutivos X_{2i-1} y/o X_{2i} puede seleccionarse para que sea complementario a la carga de la secuencia flanqueante en la proteína. Para ilustrar esto con un ejemplo, la proteína calcineurina en levaduras (véase el ejemplo 1.5) tiene dos regiones inductoras de la agregación que están flanqueadas por restos cargados en la secuencia de proteína. Las dos regiones de proteína son como sigue: NKLR FAFNIY DIDRD (SEQ ID NO: 100), y GNGE LFIVM KMMV (SEQ ID NO: 101) (se muestran las dos regiones de agregación (subrayadas) con 4 o 5 restos flanqueantes en N o C-terminal a las mismas). NKLR (SEQ ID NO: 102) tiene dos aminoácidos cargados positivamente, mientras que la carga neta de DIDRD (SEQ ID NO: 103) es menos 2 (tres restos de D cargados negativamente, 1 resto de R positivo). Por lo tanto, para las realizaciones donde los restos constitutivos tienen cargas complementarias, el resto X en el extremo N-terminal de FAFNIY (SEQ ID NO: 104) debe estar cargado negativamente, mientras que el resto X en el lado C-terminal debe estar cargado positivamente. Para la secuencia LFIVM (SEQ ID NO: 105), se aplica lo contrario: esta está flanqueada en la proteína calcineurina por una carga negativa en su lado N-terminal y por un resto de K positivo en su extremo carboxilo terminal. Por lo tanto, las moléculas con restos constitutivos complementarios tienen una carga positiva en el extremo N-terminal y una carga negativa en el otro extremo. En el ejemplo 1.5, este es el caso para las construcciones 6 y 7.

Tal como resulta evidente a partir del ejemplo DIDRD (SEQ ID NO: 103), puede haber cargas opuestas presentes en regiones flanqueantes. Para determinar la carga neta, normalmente se toman en consideración no más de 7 aminoácidos que flanquean la secuencia, preferentemente incluso menos, tal como 5, 4 o 3. Por lo tanto, la carga

neta es la suma de la carga de los restos en esta serie. Los restos inmediatamente adyacentes a la serie inductora de la agregación tienen normalmente una contribución más importante a la carga real. Por lo tanto, por ejemplo, en caso de que un resto cargado positivamente flanquee inmediatamente a la secuencia de agregación, mientras que un resto negativo se encuentre, por ejemplo, a cuatro aminoácidos de distancia cadena arriba o abajo, entonces el flanco puede considerarse cargado positivamente en lugar de ser neutro, ya que el efecto de la carga procedente del resto inmediatamente adyacente será mucho más fuerte. De acuerdo con realizaciones más particulares, solo se toma en consideración el resto que flanquea inmediatamente la secuencia propensa a la agregación para determinar la carga de la secuencia natural.

10 Restos Z_i : Enlazadores

Tal como se ha indicado en la fórmula anterior, las moléculas descritas en el presente documento también contienen restos enlazadores, Z_i . De acuerdo con realizaciones particulares, las moléculas solo contienen enlazadores internos y ningún enlazador N o C-terminal (recuérdese: la fórmula $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$ tal como se usa en el presente documento es equivalente a la fórmula $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde cada Z_2 a Z_n es un enlazador y Z_1 se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada). En otras palabras, las moléculas tienen restos constitutivos (es decir, los restos X) en ambos de sus extremos N y C-terminales. Esto corresponde a moléculas de la siguiente fórmula: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i})_n$ en donde n , i , X_{2i-1} y X_{2i} e Y_i son como se han definido anteriormente, en donde los restos están condensados entre sí mediante el uso de restos enlazadores opcionales. Ya que puede usarse un enlazador externo (N y/o C-terminal) para, por ejemplo, fusionar otros restos a las moléculas, esto también puede escribirse como $Z_0-(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, siendo X_{2i-1} y X_{2i} , Y_i , i y n como se han definido anteriormente, en donde Z_0 es un resto enlazador N-terminal opcional, Z_1 a Z_{n-1} es un enlazador y Z_n es un resto enlazador C-terminal opcional.

Por lo tanto, en realizaciones específicas, Z_n es nada (o es un enlazador de cero unidades enlazadoras).

La naturaleza de los restos enlazadores no es vital para la invención, aunque normalmente no se usan enlazadores flexibles largos. De acuerdo con realizaciones particulares, cada Z_i se selecciona independientemente de entre una serie de entre 0 y 20 unidades idénticas o no idénticas, en donde una unidad es un aminoácido, un monosacárido, un nucleótido o un monómero. Las unidades no idénticas pueden ser unidades no idénticas de la misma naturaleza (por ejemplo, aminoácidos diferentes o algunos copolímeros). También pueden ser unidades no idénticas de una naturaleza diferente, por ejemplo, un enlazador con unidades de aminoácidos y nucleótidos o un heteropolímero (copolímero) que comprende dos o más especies monoméricas diferentes. De acuerdo con realizaciones particulares, la longitud de al menos uno y particularmente cada uno de Z_i distinto de Z_n , es de al menos 1 unidad. De acuerdo con otras realizaciones particulares, Z_n es 0 unidades. De acuerdo con realizaciones particulares, todos los enlazadores Z_i distintos de Z_n son idénticos. De acuerdo con realizaciones adicionales, todos los restos Z_i son idénticos.

Los aminoácidos, monosacáridos y nucleótidos y monómeros tienen el mismo significado que en la técnica. Obsérvese que algunos ejemplos particulares de monómeros incluyen miméticos de monómeros naturales, por ejemplo, aminoácidos no proteínogénicos o de origen no natural (por ejemplo, carnitina, GABA y L-DOPA, hidroxiprolina y selenometionina), monómeros de ácidos nucleicos peptídicos y similares. Algunos ejemplos de otros monómeros adecuados incluyen, pero sin limitación, óxido de etileno, cloruro de vinilo, isopreno, ácido láctico, olefinas, tales como etileno, propileno, amidas que se encuentran en polímeros (por ejemplo, acrilamida), monómeros de acrilonitrilo-butadieno-estireno, acetato de etilvinilo y otras moléculas orgánicas que son capaces de formar polímeros.

De acuerdo con realizaciones alternativas, las unidades enlazadoras son enlazadores químicos, tales como los generados mediante acoplamiento de carbodiimida. Algunos ejemplos de carbodiimidias adecuadas incluyen, pero sin limitación, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y dicitlohexilcarbodiimida (DCC). Otro enlazador químico particularmente previsto es el ácido 4,7,10-trioxatridecano-succínico (también denominado en ocasiones ácido 4,7,10-trioxatridecano-succinámico) o Ttds.

De acuerdo con realizaciones específicas, al menos uno y particularmente todos los Z_i tienen entre 0 y 10 unidades de la misma naturaleza, en particular, entre 0 y 5 unidades de la misma naturaleza. En caso de que los enlazadores sean flexibles, se prevé particularmente el uso de enlazadores cortos. El uso de enlazadores cortos impide que dos series Y_i de la misma molécula se plieguen sobre sí mismas, ya que esto podría hacerlas menos accesibles para las proteínas de interés. Además, al asegurarse de que las diferentes series Y_i de una molécula no puedan interactuar entre sí, se aumenta la solubilidad de la molécula. De acuerdo con realizaciones particulares, los enlazadores son tan cortos que no permiten el plegamiento de las series Y_i de manera antiparalela. Por ejemplo, para aminoácidos, se necesitan al menos tres o cuatro aminoácidos para formar un giro completo, por lo que se prevén particularmente enlazadores de no más de cuatro o de no más de tres aminoácidos. Esto también depende de la naturaleza de los aminoácidos, por lo que se prevé particularmente el uso de aminoácidos que no tienen una propensión estructural concreta o una propensión a una estructura retorcida, tales como G, S y P. De acuerdo con realizaciones particulares, al menos un resto Z_i y en particular, todos los restos Z_i a excepción de Z_n , es un enlazador peptídico o polipeptídico. Algunas secuencias particularmente previstas de dichos enlazadores incluyen, pero sin limitación, PPP, PP o GS. Para restos Z_i que están formados por aminoácidos, se puede tener en cuenta la estructura primaria

(por ejemplo, en la secuencia del enlazador se incluyen muchos aminoácidos sin una inclinación por cualquier estructura particular), pero también la estructura secundaria o la terciaria. Por ejemplo, se puede elegir aminoácidos que no forman una estructura secundaria particular o que forman una hélice alfa (lineal). O, pueden seleccionarse aminoácidos de tal forma que no forman una estructura terciaria estable, ya que esto podría ocasionar que los restos Y_i quedasen inaccesibles. Los enlazadores de aminoácidos pueden formar un bucle al azar. Otro enlazador particularmente previsto es polietilenglicol (PEG), es decir, un oligómero o polímero de grupos monoméricos de óxido de etileno. Normalmente los oligómeros de PEG se abrevian, mientras que se indica el número de unidades monoméricas, por ejemplo, PEG₂, PEG₃ o (PEG)₄. De acuerdo con realizaciones particulares, al menos un resto Z_i es un oligómero de PEG (PEG, de manera abreviada). De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, todos los restos Z_i son restos de PEG. De acuerdo con otras realizaciones alternativas, al menos un resto Z_i y en particular, todos los restos Z_i a excepción de Z_n , es un enlazador de PEG.

El enlazador es preferentemente corto, para prevenir interacciones antiparalelas de los restos Y_i de la misma molécula. Sin embargo, obsérvese que en muchos casos, no se favorece la formación de una beta lámina antiparalela, a pesar de que la longitud del enlazador haría que esto fuese posible. Por ejemplo, para moléculas donde Y_i tiene la misma secuencia que la siguiente Y_i (es decir, Y_{i+1}) y esta secuencia no es simétrica, no se formará beta-lámina. Para dichas moléculas, el enlazador debe ser lo suficientemente corto como para impedir el plegamiento de las series Y_i de manera paralela - la longitud de dichos enlazadores depende de la longitud de la serie Y_i y la cantidad de unidades necesarias para formar dos giros de horquilla (es decir, longitud mínima necesaria para permitir que las Y_i se dispongan en paralelo). Cabe destacar que, esto se aplica a enlazadores flexibles que permiten el plegamiento de las moléculas. En caso de poder asegurarse de que los enlazadores sean rígidos y de que las diferentes regiones Y_i de una molécula no puedan ponerse en contacto entre sí (es decir, que no puedan interactuar entre sí), la longitud del enlazador no es realmente importante. En dichos casos, puede ser de más de 20 unidades, aunque por motivos prácticos, la longitud normalmente se limitará.

Un ejemplo particular donde se favorece el uso de enlazadores largos frente a otros enlazadores son los casos donde se usan como diana al menos dos proteínas diferentes, en particular, dos proteínas diferentes en el mismo organismo (es decir, los restos Y_i corresponden a regiones inductoras de la agregación de más de una proteína). Para asegurarse de que la molécula pueda interactuar (por ejemplo, simultáneamente) con más de una proteína, puede ser beneficioso aumentar la distancia entre los diferentes restos Y_i de direccionamiento, de tal forma que no se previene la interacción causada por impedancia estérica. En estos casos, el enlazador Z_i puede ser una serie de entre 0 y 100 unidades idénticas o no idénticas, en donde una unidad es un aminoácido, un monosacárido, un nucleótido o un monómero; o de entre 0 y 90, 0 y 80, 0 y 70, 0 y 60, 0 y 50, 0 y 40, 0 y 30 o 0 y 20. En particular, la longitud mínima del enlazador Z_i es de al menos 1 unidad, al menos 2 unidades, al menos 3 unidades, al menos 4 unidades o al menos 5 unidades.

Cuando se usan enlazadores más largos, preferentemente no son idénticos a secuencias de las proteínas de las que procede al menos una región Y_i . De acuerdo con realizaciones muy particulares, un enlazador de más de 20 unidades no es un enlazador peptídico, es decir, las unidades no son aminoácidos. De acuerdo con realizaciones alternativas, los enlazadores más largos pueden ser enlazadores peptídicos, pero los enlazadores peptídicos contienen motivos repetidos (por ejemplo, enlazadores GS, GGS, PP u otros enlazadores que contienen repeticiones de uno, dos o tres aminoácidos). En particular, el enlazador está esencialmente libre de estructura secundaria de polipéptido, por ejemplo, de series de alfa hélice o beta lámina. Cualquier predisposición del enlazador polipeptídico hacia un motivo de estructura secundaria de polipéptido limitará necesariamente el grado de libertad espacial disfrutado por los extremos del enlazador.

Observaciones generales acerca de la estructura de la molécula

Ya que hasta la fecha se han descrito miles de péptidos en la técnica, es posible que ya se hayan descrito en la técnica algunas moléculas con una estructura peptídica que se asemeje a la fórmula general (con un fin distinto), en particular, aquellas donde n es 1 (aunque hasta donde alcanza el conocimiento de los presentes inventores, no es el caso). Esto es por lo que se prevé que el ámbito de la reivindicación de producto referida a las moléculas, en particular, cuando n es 1, sea diferente al ámbito de los usos y métodos en los que pueden aplicarse estas moléculas. Por consiguiente, la memoria descriptiva describe que cuando n es 1, se prevé que los restos X se seleccionen de manera más restrictiva (por ejemplo, solo entre R, K, E, D, P; o, por ejemplo, excluyendo K, véase lo anterior), que los restos X sean más cortos (por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos) y que no existan de exclusivamente restos de K, que los restos Y sean más cortos (por ejemplo, una longitud no mayor de 13, 11 o 10 aminoácidos), se seleccionen de entre un intervalo de diferentes longitudes (por ejemplo, de 5 a 12 aminoácidos o de 5 a 10 aminoácidos) o se seleccionen de un modo más riguroso (por ejemplo, ausencia de restos específicos, tales como P, R, K, D, E, por ejemplo, más de un 60% hidrofóbicos, ...) que en caso de que n sea al menos dos.

Las moléculas descritas particularmente son aquellas con la siguiente estructura: $X_1-Y_1-X_2-Z_1$ (es decir, n es 1), en donde X_1 y X_2 tienen en total no más de 5 aminoácidos; Y_1 es una serie de entre 4 y 10 aminoácidos y Z_1 es una serie de 0 unidades; y $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2$ (es decir, n es 2), en donde Z_1 es un enlazador y Z_2 es nada.

Las combinaciones de limitaciones que se prevén para realizaciones donde $n=1$ incluyen:

- X_1 y X_2 son iguales entre sí y tienen 1 o 2 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; y
- Y_1 es una serie de 6 a 10 aminoácidos contiguos, de los que al menos 3 son hidrofóbicos, en la que no hay restos de P, R, K, D, E o H presentes, en la que la suma total de restos de C, M, N, Q y W es de no más de 1, de los cuales, menos de un 60% son aminoácidos pequeños distintos de V (es decir, seleccionados de entre A, C, G, S, P, N, T, D), en la que hay presentes no más de 2 aminoácidos idénticos consecutivos, en la que ningún resto no alifático está presente más de dos veces y en la que el primer y el último resto son alifáticos o se seleccionan de entre F, Y, W, A, M y T.

Otra combinación particular, donde $n = 1$, es

- X_1 y X_2 son 1 o 2 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; y
- Y_1 es una serie de 6 a 11 aminoácidos contiguos, de los cuales, al menos un 75% son aminoácidos hidrofóbicos, en la que al menos un 50% de los aminoácidos son restos alifáticos o de F, en la que no hay restos de P, R, K, D, E o H presentes, en la que no hay más de un resto de C, M, N, Q, W, G, S, A o T presente, en la que no hay más de 3 restos de Y o F presentes, en la que no hay más de dos restos no alifáticos idénticos contiguos presentes (es decir, no hay presentes 2 restos contiguos de Y o F, o únicamente I, L y V pueden ser restos contiguos idénticos) y no hay presentes más de 2 restos alifáticos idénticos contiguos, - en la que no hay más de dos restos polares no aromáticos (es decir, seleccionados de entre S, N, T y Q) consecutivos presentes, en donde no hay más de un 50% de restos idénticos presentes, en donde el 1^{er} y/o el último resto es un resto alifático o de F, en donde la suma de restos de A y G no es mayor de 2, en donde el porcentaje total de restos de A, G y S es de no más del 25%, en donde el porcentaje total de restos de C, M, N, Q y W es de no más del 25% y en donde el porcentaje total de restos pequeños distintos de V (es decir, seleccionados de entre A, C, G, S, N, T) es de no más del 25%.

De acuerdo con algunas realizaciones particulares, Z_1 no está presente (es decir, Z_1 es cero unidades). De acuerdo con otras realizaciones, Z_1 también está presente y puede ser N o C-terminal.

Cabe destacar que, aunque se prevén particularmente estas combinaciones y de hecho, describen un espacio de secuencia de compuestos que funcionan bien, estas limitaciones pretenden asegurar principalmente que no hay solapamiento entre los compuestos reivindicados en el presente documento y lo que se ha descrito en la técnica anterior. También puede darse el caso de que estas limitaciones sean demasiado rigurosas o que algunas sean demasiado rigurosas y otras no lo suficientemente rigurosas. Por lo tanto, se prevé que puede variarse uno cualquiera de estos criterios de acuerdo con los límites descritos anteriormente para los restos individuales y/o que puedan omitirse algunos de los criterios o reemplazarse por otras limitaciones y/o que puedan añadirse otras limitaciones.

Otros restos

La molécula puede comprender además (o puede estar además fusionada a) otros restos. Para todos los restos, no es vital para la invención la naturaleza de la fusión o del enlazador, en tanto que el resto y la molécula agregadora puedan ejercer su función específica. De acuerdo con realizaciones particulares, los restos que están fusionados a las moléculas pueden escindirse (por ejemplo, usando un resto enlazador que tiene un sitio de reconocimiento por proteasas). De esta manera, pueden separarse la función del resto y de la molécula, lo que puede ser particularmente interesante para restos más grandes o para realizaciones donde el resto deja de ser necesario transcurrido punto de tiempo específico (por ejemplo, un marcador que se escinde después de una etapa de separación usando el marcador).

Se prevé particularmente que la molécula comprende además un marcador detectable. El marcador detectable puede encontrarse en N o C-terminal o incluso puede estar fusionado a la molécula (por ejemplo, a través del enlazador o el enlazador puede usarse como marcador detectable). Como alternativa, el marcador detectable puede referirse al uso de uno o más aminoácidos marcados en uno o más de los restos X-Y-Z de la molécula (por ejemplo, aminoácidos marcados fluorescente o radiactivamente).

Obsérvese que, para realizaciones donde está presente Z_n , el marcador detectable puede fusionarse al resto enlazador Z_n . (Aunque esta notación implicaría que el marcador se añada al extremo C-terminal, también se prevén marcadores N-terminales - esto corresponde a la notación equivalente de $(Z_i-X_{2i-1}-Y_i-X_{2i})_n$, en donde cada Z_2 a Z_n es un enlazador y Z_1 es el enlazador al que se fusiona el marcador).

Sin embargo, ya que la naturaleza del enlazador al que se fusiona el marcador detectable puede diferir significativamente de la usada en la molécula, en particular respecto de las restricciones de longitud, puede ser preferible referirse a las moléculas marcadas de este modo como moléculas donde el resto Z_n está ausente y donde se fusiona un marcador detectable a la molécula usando un enlazador separado. De hecho, los enlazadores usados para añadir el marcador a las moléculas pueden ser tanto largo como flexible. Sin embargo, el modo real de acoplamiento del marcador detectable a las moléculas no es vital para la invención y normalmente dependerá de la naturaleza del marcador usado y/o del propósito del marcaje (que puede determinar la proximidad requerida). Obsérvese que, en principio, puede usarse cualquier marcador conocido para moléculas de naturaleza proteica, en

tanto que el marcador pueda detectarse. Los marcadores particularmente previstos incluyen, pero sin limitación, marcadores, marcadores fluorescentes, sustratos enzimáticos, enzimas, puntos cuánticos, nanopartículas que pueden ser (para)magnéticas, radiomarcadores, marcadores ópticos y similares.

5 Al igual que con otros restos, ya que las moléculas tienen dos extremos, se prevé que las moléculas se fusionarán a otro resto (por ejemplo, un marcador) tanto en su extremo N como en su extremo C-terminal. Estos dos marcadores pueden ser idénticos (proporcionando una señal más fuerte) o diferentes (para diferentes fines de la detección). Los restos, tales como marcadores, pueden fusionarse a través de los enlazadores Z_0 y/o Z_n o mediante enlazadores largos.

10 De acuerdo con realizaciones particulares, el marcador detectable no es GFP o biotina. De acuerdo con otras realizaciones particulares, el marcador detectable puede ser biotina o GFP.

15 De acuerdo con otras realizaciones particulares, las moléculas pueden fusionarse a otros restos, por ejemplo, para prolongar su semivida *in vivo*. Aparte de aumentar la estabilidad, dichos restos también pueden aumentar la solubilidad de la molécula a la que están fusionados. Aunque la presencia de restos constitutivos (los restos X numerados) es, en principio, suficiente para impedir la agregación prematura de las moléculas y las mantienen en solución, la adición complementaria de un resto que aumenta la solubilidad (es decir, previene la agregación) puede proporcionar un manejo más fácil de las moléculas y en particular, mejora la estabilidad y la vida útil. Un ejemplo de
20 sobra conocido de dicho resto es PEG (polietilenglicol). Esto se prevé particularmente, ya que puede usarse como enlazador y como resto solubilizante. Otros ejemplos incluyen péptidos y proteínas o dominios de proteínas o incluso proteínas completas (por ejemplo, GFP). A este respecto, cabe destacar que, al igual que PEG, un resto puede tener diferentes funciones o efectos. Por ejemplo, un marcador flag (secuencia, DYKDDDDK (SEQ ID NO: 106)) es un resto peptídico que puede usarse como marcador, pero debido a su densidad de carga, también potenciará la
25 solubilización. Ya se ha demostrado en numerosas ocasiones que la PEGilación aumenta la solubilidad de agentes biofarmacéuticos (por ejemplo, Veronese y Mero, *BioDrugs*. 2008; 22(5):315-29). La adición de un péptido, polipéptido, proteína o marcador de dominio de proteína a una molécula de interés se ha descrito exhaustivamente en la técnica. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, péptidos derivados de sinucleína (por ejemplo, Park et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 2004; 17:251-260), SET (marcador potenciador de la solubilidad, Zhang et al., *Protein Expr Purif* 2004; 36:207-216), tioredoxina (TRX), glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), sustancia de utilización de N (NusA), modificador similar a ubiquitina pequeño (SUMO), ubiquitina (Ub), enlace disulfuro C (DsbC), proteína de diecisiete kilodalton (Skp), fragmento de proteína cinasa de fago T7 (T7PK), dominio B1 de proteína G, dominio de repetición ZZ de IgG de proteína A y dominios de unión a inmunoglobulina bacterianos (Hutt et al., *J Biol Chem*; 287(7):4462-9, 2012). La naturaleza del marcador dependerá de la aplicación, tal como
35 puede determinarse por la persona experta. Por ejemplo, para la expresión transgénica de las moléculas descritas en el presente documento, puede preverse fusionar las moléculas a un dominio mayor, para prevenir la degradación prematura por la maquinaria celular. Otras aplicaciones pueden prever la fusión a un marcador de solubilización más pequeño (por ejemplo, menos de 30 aminoácidos o menos de 20 aminoácidos o incluso menos de 10 aminoácidos) para no alterar demasiado las propiedades de las moléculas.

40 Aparte de prolongar la semivida, las moléculas pueden fusionarse a restos que alteran otras propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas adicionales. Por ejemplo, se sabe que la fusión con albúmina (por ejemplo, albúmina sérica humana), el dominio de unión a albúmina o un péptido de unión a albúmina sintético mejora la farmacocinética y la farmacodinámica de diferentes proteínas terapéuticas (Langenheim y Chen, *Endocrinol.*; 203(3):375-87, 2009). Otro resto que suele usarse es un fragmento de región cristalizable (Fc) de un anticuerpo. La naturaleza de estos restos no es vital para la invención y puede determinarse por el experto en la materia dependiendo de la aplicación.

50 De acuerdo con realizaciones particulares, las moléculas no se fusionan a una perla de agarosa, una perla de látex, una perla de celulosa, una perla magnética, una perla de sílice, una perla de poliacrilamida, una microesfera, una perla de vidrio o cualquier soporte sólido (por ejemplo, poliestireno, plástico, membrana de nitrocelulosa, vidrio) o la proteína NusA. (Obsérvese, sin embargo, que estas fusiones son posibles y en realizaciones específicas, también se prevén).

55 Otros restos que también se prevén en combinación con las moléculas descritas en el presente documento son restos de direccionamiento. Por ejemplo, las moléculas pueden fusionarse a, por ejemplo, un anticuerpo, un péptido o una molécula pequeña con especificidad por una diana dada y la molécula inicia la agregación en el sitio de la diana (en este caso, las regiones Y_i tendrán una secuencia idéntica a una presente en la misma proteína diana u otra diferente o la secuencia será una con una alta propensión a la agregación). Esto es similar a la estrategia que se indica en el documento WO2008148751. En la página 3 (a partir de la línea 26) y la página 4 (terminando en la
60 línea 34) del documento WO2008148751 se describe una lista exhaustiva de los demás restos diana (también denominados "regiones de unión" o "dominios de unión" en el documento WO2008148751) que pueden combinarse con las moléculas de la invención: la expresión "región de unión" o "dominio de unión" se refiere normalmente a una molécula que interactúa con la proteína diana. En ciertos casos, un dominio de unión es un compuesto químico (por
65 ejemplo, un compuesto pequeño con afinidad por al menos una proteína diana) y en otros casos concretos, un dominio de unión es un polipéptido, en otros casos concretos, un dominio de unión es un dominio de proteína. Un

dominio de unión de proteína es un elemento de estructura general de proteína que se estabiliza por sí mismo y a menudo se pliega de manera independientemente del resto de la cadena de proteína. Los dominios de unión varían en cuanto a su longitud, de entre aproximadamente 25 aminoácidos hasta 500 aminoácidos y más. Muchos dominios de unión pueden clasificarse en pliegues y son estructuras en 3-D reconocibles e identificables. Algunos pliegues son tan comunes en muchas proteínas distintas que se les otorgan nombres especiales. Algunos ejemplos no limitantes son pliegues de Rossman, barriles TIM, repeticiones armadillo, cremalleras de leucina, dominios de cadherina, dominios efectores de muerte, dominios similares a inmunoglobulina, dominio de unión a fosfotirosina, dominio de homología de plestrina, dominio 2 de homología con src, el dominio BRCT de BRCA1, dominios de unión a proteína G, el dominio de homología Eps 15 (EH) y el dominio de unión a proteína de p53. Los anticuerpos son el prototipo natural de proteínas de unión específica con especificidad mediada a través de las regiones de bucle hipervariable, las denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Aunque en general, se ha demostrado que los armazones de anticuerpo funcionan bien como moléculas de unión específicas, se ha evidenciado que no es obligatorio ceñirse al paradigma de un almacén rígido que presente bucles similares a las CDR. Además de anticuerpos, muchas otras proteínas naturales median interacciones específicas de alta afinidad entre dominios. Las alternativas a las inmunoglobulinas han proporcionado puntos de partida atractivos para el diseño de nuevas moléculas de unión (reconocimiento). El término almacén, tal como se usa en la presente invención, se refiere a una cadena principal de proteína que porta aminoácidos alterados o inserciones de secuencia que confieren unión a proteínas diana específicas. El diseño por ingeniería de armazones y el diseño de bibliotecas son procesos mutuamente interdependientes. Para obtener moléculas de unión específicas, ha de generarse una biblioteca combinatoria del almacén. Esto se efectúa normalmente a nivel de ADN aleatorizando los codones en posiciones de aminoácidos adecuadas, usando codones o trinucleótidos degenerados. En la actualidad se usan para la presentación en bibliotecas combinatorias una gran variedad de diferentes armazones no de inmunoglobulina con orígenes y características muy diversos. Algunos de estos son comparables en cuanto a su tamaño a un scFv de un anticuerpo (aproximadamente 30kDa), aunque en su mayoría son mucho más pequeños. Los armazones modulares basados en proteínas de repetición varían en cuanto a su tamaño dependiendo del número de unidades repetitivas. Una lista no limitante de ejemplos comprende moléculas de unión basadas en el 10º dominio de fibronectina de tipo II, moléculas de unión basadas en lipocalinas, moléculas de unión basadas en dominios SH3, moléculas de unión basadas en miembros de la familia de knottina, moléculas de unión basadas en CTLA-4, receptores de linfocitos T, neocarcinostatina, módulo 4-2 de unión a carbohidratos, tendamistat, inhibidores de dominio kunitz, dominios PDZ, dominio de homología a Src (SH2), toxinas de escorpión, defensina A de insecto, proteínas de dedo de homeodominio de plantas, enzima TEM-1 beta-lactamasa bacteriana, dominio de unión a Ig de proteína A de *Staphylococcus aureus*, proteína de inmunidad colicina E7 de *E. coli*, citocromo b562 de *E. coli*, dominios de repetición de anquirina. También se incluyen como dominios de unión compuestos con especificidad por una proteína diana dada, moléculas de unión peptídicas cíclicas y lineales, aptámeros peptídicos, proteínas de avímero multivalentes o fármacos inmunofarmacéuticos modulares pequeños, ligandos con especificidad por un receptor o un co-receptor, compañeros de unión a proteína identificados en un análisis de dos híbridos, dominios de unión basados en la especificidad de la interacción de alta afinidad de biotina-avidina, dominios de unión basados en la especificidad de las proteínas de unión a ciclofilina-FK506. También se incluyen lectinas con afinidad por una estructura de carbohidrato específica.

Cabe destacar que, para aquellas realizaciones donde las moléculas se fusionan a un resto de direccionamiento, se prevé específicamente que al menos uno, pero hasta cada uno de los restos Y_i sean una secuencia sintética, más particularmente, una secuencia que no esté presente en una proteína del organismo al que se administra la molécula. De hecho, en dichos casos, puede preverse la nucleación de la agregación *in situ* (tras alcanzar la proteína diana) mediante la agregación nucleada de las moléculas interferidoras fusionadas al resto de direccionamiento.

Sin embargo, obsérvese que los restos de direccionamiento no son necesarios, ya que las moléculas son en sí mismas capaces de hallar su diana mediante reconocimiento específico de secuencia. Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones alternativas, las moléculas pueden usarse de manera eficaz como resto de direccionamiento y pueden fusionarse además a otros restos, tales como fármacos, toxinas o moléculas pequeñas. Al dirigir las moléculas a proteínas específicas (por ejemplo, proteínas que se producen únicamente en un tipo celular o un compartimento celular particular), estos compuestos pueden dirigirse al tipo/compartimento celular específico. Por lo tanto, por ejemplo, pueden suministrarse toxinas de manera selectiva a células de cáncer o pueden suministrarse fármacos en el citoplasma.

De acuerdo con otras realizaciones alternativas, las moléculas pueden comprender además una secuencia que media la penetración en la célula (o la traslocación celular), es decir, las moléculas se modifican adicionalmente mediante el acoplamiento recombinante o sintético de una secuencia de penetración en células. La molécula interferidora (por ejemplo, en forma de un polipéptido) puede además fusionarse o acoplarse químicamente a una secuencia que facilita la transducción de las proteínas de fusión o acopladas químicamente al interior de células procariontas o eucariotas. Las secuencias de péptidos de penetración en células (CPP) o de dominios de transducción de proteínas (PTD) se conocen bien en la técnica e incluyen, pero in limitación, la proteína TAT del VIH, una secuencia de poliarginina, penetratina y pep-1. Otros péptidos permeables a la membrana comúnmente usados (péptidos tanto naturales como artificiales) se divulgan, por ejemplo, en Sawant y Torchilin, *Mol Biosyst.* 6(4):628-40, 2010; Noguchi et al., *Cell Transplant.* 19(6):649-54, 2010 y Lindgren y Langel, *Methods Mol Biol.* 683:3-

19, 2011.

Para CPP, lo típico es su carga, por lo que es posible que algunas moléculas cargadas descritas en el presente documento no necesiten un CPP para entrar en una célula. De hecho, tal como se demostrará en los ejemplos, es posible dirigirse a péptidos de señal o a regiones intracelulares, que requieren que las moléculas sean captadas por la célula y esto se produce sin fusión a un CPP.

En estos casos donde se fusionan otros restos a las moléculas, se prevé en realizaciones particulares que estos restos pueden eliminarse de la molécula. Típicamente, esto se efectuará incorporando un sitio de escisión de proteasas específico o una estrategia equivalente. Este es particularmente el caso donde el resto es una proteína grande: en dichos casos, el resto puede escindir-se antes de usar la molécula en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, durante la purificación de las moléculas). El sitio de escisión puede incorporarse por separado o puede ser una parte integral del enlazador Z_n externo (o un enlazador Z_1 externo en caso de que el resto sea N-terminal). De acuerdo con realizaciones muy específicas, el resto puede formar parte de un enlazador Z_i interno o puede ser incluso el enlazador Z_i completo. A modo de ejemplo, una molécula con $n=2$ podría tener la siguiente estructura: $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4$, en donde Z_1 (en su totalidad o en parte) es una secuencia de hexahistidina: por lo tanto, esta es tanto el enlazador como la secuencia de detección. Aunque es posible, en estos casos normalmente no se incorporará un sitio de escisión, ya que esto podría ocasionar la escisión de la molécula en sí. Obsérvese que, de acuerdo con las realizaciones donde el resto adicional está fusionado de manera interna, solo se prevén como restos de solubilización secuencias no proteicas (por ejemplo, PEG) o peptídicas con una longitud limitada (menos de 30, 20 o 10 aminoácidos, véase lo anterior). De lo contrario, el dominio de proteína podría interferir con la inducción de la agregación.

De acuerdo con realizaciones específicas, la longitud total de las moléculas descritas en el presente documento no supera los 50 aminoácidos. Más particularmente, la longitud no supera los 40 aminoácidos, 30 aminoácidos, 25 aminoácidos o incluso 20 aminoácidos. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales donde las moléculas se fusionan a restos adicionales, la limitación de la longitud solo se aplica a la parte $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$ de la molécula total (y por lo tanto, por ejemplo, no al marcador). Por lo tanto, en caso de que se haya incorporado un sitio de escisión en la molécula, la restricción de longitud se aplica normalmente a la longitud después de la escisión.

Para moléculas que son completamente proteicas, se prevé que puedan proporcionarse en forma de ácidos nucleicos, por ejemplo, en forma de un vector recombinante que incluye una secuencia que codifica al menos una molécula descrita en el presente documento.

Aplicaciones particulares de las moléculas

De acuerdo con un aspecto adicional, las moléculas descritas en el presente documento pueden usarse para regular a la baja o inhibir la función de una proteína. Típicamente, esto se logra induciendo la agregación de dicha proteína. La presente memoria descriptiva describe métodos para regular a la baja la función de una proteína que comprenden poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Más particularmente, la memoria descriptiva describe que cuando n es 1, Y_1 puede ser una serie de 4 a 11 aminoácidos contiguos. De acuerdo con estos ejemplos, Z_1 puede ser nada (es decir, una serie de 0 unidades) o un enlazador distinto de un enlazador de aminoácidos o cualquier enlazador previsto en el presente documento (es decir, no se aplican limitaciones adicionales a Z_1).

Para las moléculas, se aplican las mismas consideraciones y limitaciones anteriores. En particular, cabe destacar que, en tanto que se logre la regulación a la baja de la función, pueden tolerarse una o dos sustituciones en la Y_i que se produce en la proteína, tal como se ha descrito anteriormente. Típicamente, sin embargo, Y_i será idéntico.

Las moléculas pueden usarse en una gran variedad de campos, incluyendo biotecnología blanca (o biotecnología industrial), biotecnología roja o médica, biotecnología verde o agrícola, biotecnología azul (o acuática). También pueden usarse para inhibir proteínas, así como para detectar proteínas y esto en todos estos campos. Tal como se verá, las aplicaciones en las que se administran las moléculas a un sujeto muestran similitudes significativas en los

campos, es decir, en aplicaciones tanto médicas (sujetos animales) como agrícolas (sujetos vegetales), puede hacerse una subdivisión para aplicaciones infecciosas y no infecciosas.

Aplicaciones médicas para los interferidores

5 Existen dos campos amplios de aplicaciones médicas para las moléculas descritas en el presente documento, a saber, enfermedades infecciosas y enfermedades no infecciosas. La gran diferencia entre las aplicaciones es que, en situaciones de enfermedades infecciosas, la molécula interferidora se dirigirá normalmente a al menos una proteína del patógeno (o los patógenos) que causa(n) la infección, mientras que normalmente se administra a un
10 sujeto cuyo proteoma no sea la diana (es decir, la serie Y_i corresponde a una en el proteoma de un patógeno, pero no se produce en el proteoma del sujeto con la infección). Sin embargo, también se prevé el direccionamiento directo al patógeno (por ejemplo, cuando se tratan infecciones con ectoparásitos).

15 En los trastornos no infecciosos, la molécula interferidora se dirigirá normalmente a al menos una proteína presente en el sujeto al que se administra el interferidor.

Se aplica la misma consideración (administración a un organismo y presencia en el proteoma de la serie Y_i en dicho organismo) de enfermedad no infecciosa e infecciosa para la aplicación de interferidores en plantas, pero estas normalmente no se consideran aplicaciones médicas. Por lo tanto, aunque pueden ponerse en prácticas métodos
20 similares en plantas (véase más adelante), los métodos descritos en esta sección se consideran métodos médicos, ya que normalmente implican un sujeto animal en lugar de un sujeto vegetal.

De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, estos métodos se proporcionan para regular a la baja una proteína en una situación de enfermedad o para efectuar un diagnóstico. La memoria descriptiva describe una
25 molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de
30 entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se
35 seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde si n es 1, Y_1 es una serie de 4 a 11 aminoácidos contiguos (y de acuerdo con realizaciones particulares
40 adicionales, Z_1 no es un enlazador de aminoácidos); para su uso como medicamento o en diagnósticos.

Tal como se usa en el presente documento, los métodos y usos son a menudo intercambiables, es decir, una molécula para su uso como medicamento o una molécula para su uso en el tratamiento de una enfermedad
45 específica equivale a un método para tratar la enfermedad que comprende el uso de (por ejemplo, la puesta en contacto con) la molécula.

De acuerdo con realizaciones particulares, en caso de que la molécula se use como medicamento o agente diagnóstico, se prevé que se usen como moléculas exógenas que se administran y no como transgén. Esto también
50 se aplica para moléculas no usadas como medicamento. De acuerdo con realizaciones alternativas, las moléculas pueden administrarse como transgén, así como una molécula exógena.

En caso de que las moléculas se administren como transgenes (es decir, como ácidos nucleicos que codifican las moléculas), huelga decir que las moléculas interferidoras de acuerdo con estas realizaciones son de naturaleza
55 completamente polipeptídica, ya que es necesario que puedan codificarse. Es decir, todos los restos X, Y y Z presentes en las moléculas interferidoras son de naturaleza polipeptídica. Las aplicaciones médicas en las que se prevé el suministro transgénico incluyen, pero sin limitación, métodos de terapia génica (por ejemplo, usando lentivirus) o aplicaciones en células madre.

Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula que tiene la siguiente estructura:

60 $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de
65 entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de

que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y

- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

5 Se prevé particularmente que las secuencias de ácido nucleico codifiquen las moléculas con todas las limitaciones y variaciones descritas en el presente documento, *mutatis mutandis*. Por lo tanto, el polipéptido codificado es esencialmente como se ha descrito en el presente documento, es decir, las variaciones mencionadas para las moléculas interferidoras que sean compatibles con este aspecto también se prevén como variaciones para los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico. A modo de ejemplo, las realizaciones que especifican la secuencia o la longitud de los restos X o Y son compatibles con estar codificadas en ácidos nucleicos, las realizaciones en donde el resto Z es de naturaleza no aminoacídica no lo son.

15 De acuerdo con realizaciones específicas, la secuencia de polipéptido codificada es un polipéptido de origen no natural. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la secuencia de ácido nucleico es un gen artificial. Ya que el aspecto del ácido nucleico es particularmente adecuado en aplicaciones que emplean expresión transgénica, las realizaciones particularmente previstas son aquellas donde la secuencia de ácido nucleico (o el gen artificial) se fusiona a otro resto, en particular, un resto que aumenta la solubilidad y/o la estabilidad del producto génico. De hecho, en ocasiones, la expresión transgénica de péptidos puede ser difícil, debido a la rápida degradación del producto.

Cabe destacar que todos los métodos y usos que implican las moléculas de la solicitud también abarcan, por tanto, métodos y usos donde las moléculas se proporcionan en forma de la secuencia de ácido nucleico que las codifica y las moléculas se expresan a partir de la secuencia de ácido nucleico.

25 La memoria descriptiva también describe vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula como se ha descrito en el presente documento. Estos vectores recombinantes son idealmente adecuados como vehículos para portar la secuencia de ácido nucleico de interés al interior de una célula donde se expresa la proteína que se vaya a regular a la baja y dirigir la expresión del ácido nucleico en dicha célula. El vector recombinante puede permanecer en forma de una entidad separada en la célula (por ejemplo, en forma de un plásmido) o puede integrarse en el genoma de la célula. Los vectores recombinantes incluyen, entre otros, vectores plasmídicos, vectores binarios, vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera y vectores víricos. Por lo tanto, en el presente documento también se abarcan métodos y usos donde las moléculas se proporcionan en forma de vectores recombinantes con una secuencia de ácido nucleico que codifica las moléculas y las moléculas se expresan a partir de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el vector recombinante.

40 La memoria descriptiva también describe células que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula, tal como se ha descrito en el presente documento o que comprenden un vector recombinante que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha molécula interferidora. La célula puede ser una célula procarionota o eucariota. En este último caso, puede ser una célula de levadura, alga, vegetal o animal (por ejemplo, una célula de insecto, mamífero o humana). Por lo tanto, en el presente documento también se abarcan métodos y usos donde las moléculas se proporcionan en forma de células con una secuencia de ácido nucleico que codifica las moléculas y las moléculas se expresan a partir de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en las células. Este puede ser el caso, por ejemplo, en la terapia con células madre.

45 Obsérvese que la estrategia transgénica no se limita a aplicaciones médicas. De acuerdo con realizaciones muy particulares, proporcionar las moléculas interferidoras codificadas en ácido nucleico en lugar de directamente en forma de polipéptidos es particularmente adecuado para su uso en plantas, como se describirá más adelante. Por consiguiente, la memoria descriptiva describe plantas o células vegetales o semillas de plantas, que contienen una secuencia de ácido nucleico, un gen artificial o un vector recombinante como se ha descrito en el presente documento.

50 En realizaciones específicas, la invención proporciona un método para la producción o fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula interferidora y además mezcla dicha al menos una molécula interferidora con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Es decir, el interferidor se proporciona para su uso como medicamento o se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen interferidores.

60 En una realización preferida, la molécula interferidora es un polipéptido (lo que significa que todos los restos enlazadores Z_n presentes son de naturaleza polipeptídica) y pueden prepararse mediante síntesis química o como alternativa, en forma de una proteína recombinante. (Obsérvese que las características de las moléculas interferidoras para uso médico también se prevén para uso no médico, en los casos donde sea aplicable).

65 Un "polipéptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí mediante enlaces de amida, como alternativa, citados como un péptido. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, puede usarse el isómero óptico L o el isómero óptico D. Además, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, beta-alanina, fenilglicina y homoarginina. También pueden usarse en la presente invención aminoácidos

encontrados comúnmente que no están codificados por genes. Todos o parte de los aminoácidos usados en los interferidores pueden ser el isómero D o L. Además, también son útiles otros peptidomiméticos en la presente invención. Los presentes inventores hacen referencia e incorporan en el presente documento de manera específica la revisión acerca del desarrollo y uso de peptidomiméticos como antagonistas para interacciones proteína-proteína de Sillerud LO y Larson RS (2005) *Curr Protein Pept Sci.* 6(2):151-69. Además, Pueden añadirse D-aminoácidos a la secuencia de péptido para estabilizar las características de giro (especialmente en el caso de la glicina). En otra estrategia, pueden usarse miméticos de giro alfa, beta, gamma o delta (tales como alfa, beta, gamma o delta di-péptidos) para imitar motivos estructurales y características de giros en un péptido y simultáneamente, proporcionan estabilidad frente a la proteólisis y potencian otras propiedades, tales como, por ejemplo, estabilidad conformacional y solubilidad.

Puede fabricarse un interferidor recombinante usando sistemas de expresión adecuados que comprenden células bacterianas, células de levadura, células animales, células de insecto, células vegetales o animales o plantas transgénicos. El interferidor recombinante puede purificarse mediante cualquier procedimiento de purificación de proteínas o péptidos convencional hasta prácticamente la homogeneidad y/o mezclarse con aditivos. En otra realización más, dicho interferidor es un polipéptido modificado químicamente. La síntesis química permite la conjugación de otras moléculas pequeñas o la incorporación de aminoácidos no naturales mediante diseño. En una realización particular, la conjugación de moléculas pequeñas a un péptido interferidor podría dar lugar a una aplicación potencial de estas moléculas en el área de crecimiento de agentes citotóxicos dirigidos para terapia antitumoral. La incorporación de aminoácidos no naturales en el péptido abre la posibilidad de una mayor diversidad química, análoga a estrategias de química médica de molécula pequeña para desarrollar un reconocimiento molecular de alta afinidad y alta especificidad. Los aminoácidos no naturales también pueden prevenir una rápida degradación del péptido interferidor haciendo que el péptido no sea reconocible para las proteasas (por ejemplo, séricas o del estómago). En otra realización más, las moléculas interferidoras de la invención comprenden aminoácidos modificados, tales como un D-aminoácido o un aminoácido modificado químicamente. En otra realización más, dicho interferidor consiste en una mezcla de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En otra realización más, la puede prolongarse la semivida de un péptido mediante modificaciones, tales como glucosilación (Haubner R. et al (2001) *J. Nucl. Med.* 42, 326-336), conjugación con polietilenglicol (PEGilación, véase Kim TH et al (2002) *Biomaterials* 23, 2311-2317) o diseño del péptido por ingeniería para que se asocie con albúmina sérica (véase Koehler MF et al (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2883-2886). La administración de una composición farmacéutica que comprende una molécula interferidora puede ser mediante administración oral, inhalada, transdérmica o parenteral (incluyendo intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, intratecal y subcutánea). Los ejemplos particularmente preferidos de métodos de suministro para interferidores son un parche transdérmico (Henry S et al (1998) *J. Pharm. Sci.* 87, 922-925), iontoforesis (Suzuki Y et al (2002) *J. Pharm. Sci.* 91, 350-361), sonoforesis (Boucaud A et al (2002) *J. Control. Release* 81, 113-119), aerosoles (Duddu SP et al (2002) *Pharm. Res.* 19, 689-695), transferosomas o liposomas (Guo J et al (2000) *Drug Deliv.* 7, 113-116). El interferidor puede administrarse solo o se formula preferentemente en forma de una composición farmacéutica. (Esto significa que se proporcionan métodos que comprenden la administración del interferidor solo o se formulan en forma de una composición farmacéutica).

Se prefiere que el interferidor o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administre en forma de una composición de dosis unitaria, tal como una composición en dosis unitaria oral, parenteral, transdérmica o inhalada. Dichas composiciones se preparan mediante mezclado y están adaptadas de manera adecuada para administración oral, inhalada, transdérmica o parenteral y como tales, pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas para chupar, polvos reconstituibles, soluciones o suspensiones inyectables e infusibles o supositorios o aerosoles.

Ya que las moléculas se proporcionan para su uso como medicamento o en diagnósticos o en métodos de tratamiento o de diagnóstico, también se prevé que puedan proporcionarse en forma de agentes farmacéuticos. Por consiguiente, la memoria descriptiva describe composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas descritas en el presente documento. En particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos una molécula que tiene la siguiente estructura:

$(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Más particularmente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una molécula que

tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde

- 5 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
 - 10 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; en donde al menos una Y_i es una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos de origen natural en una proteína; y
 - 15 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;
- 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La memoria descriptiva describe que en donde n es 1, Y_1 será normalmente una serie de 4 a 11 aminoácidos contiguos y Z_1 no es un enlazador de aminoácidos (o puede ser incluso nada).

- 20 Más particularmente, en las composiciones farmacéuticas, al menos una Y_i de las moléculas está presente en una proteína que se vaya a regular a la baja en el sujeto al que se administrará la composición. Obsérvese que esto no implica que esta proteína esté codificada en el genoma de dicho sujeto. De hecho, para sujetos que padecen una infección, se prevé que se administren moléculas que se dirijan específicamente a proteínas del organismo infeccioso y no del sujeto en sí. (Nuevamente, obsérvese que se aplican consideraciones similares para
- 25 composiciones que se vayan a administrar a sujetos vegetales, es decir, composiciones agroquímicas. Estas pueden dirigirse a proteínas vegetales o a proteínas de organismos infecciosos).

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen uno o más interferidores de la presente invención. Estas composiciones pueden usarse para lograr el efecto farmacológico deseado mediante su

30 administración a un paciente que lo necesite. Un paciente, a efectos de la presente invención, es un mamífero, incluyendo un ser humano, que necesite tratamiento para la afección o enfermedad particular. Por lo tanto, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que están formadas por un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un interferidor o una sal del mismo, de la presente invención. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es, preferentemente, un vehículo que es relativamente no tóxico e inócuo para un paciente a concentraciones consistentes con una actividad eficaz del principio activo, de tal forma que cualquier efecto secundario atribuible al vehículo no vicia los efectos beneficiosos del principio activo. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de interferidor es preferentemente aquella cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia en la afección concreta que se vaya a tratar. Los interferidores de la presente invención pueden administrarse con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica usando cualquier forma

40 farmacéutica unitaria convencional, incluyendo preparaciones de liberación inmediata, lenta y controlada, por vía oral, por vía parenteral, por vía tópica, por vía nasal, por vía oftálmica, por vía óptica, por vía sublingual, por vía rectal, por vía vaginal y similares.

Para administración oral, pueden formularse los interferidores en preparaciones sólidas o líquidas, tales como

45 cápsulas, píldoras, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, fundidos, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones y pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas. Las formas farmacéuticas unitarias pueden ser una cápsula que puede ser de tipo convencional de gelatina dura o blanda que contienen, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz.

50

En otra realización, los interferidores de la presente invención pueden comprimirse con bases para comprimidos convencionales, tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes, tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes previstos para ayudar en la rotura y la disolución del comprimido después de su administración, tales como almidón de maíz, ácido alginico, almidón de maíz y goma

55 guar, goma de tragacanto, goma arábiga, lubricantes pensados para mejorar el flujo de la granulación del comprimido y para prevenir la adhesión del material del comprimido a las superficies de los moldes para comprimidos, por ejemplo, talco, ácido esteárico o estearato de magnesio, calcio o cinc, colorantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes, tales como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza, pensados para mejorar las cualidades estéticas de los comprimidos y hacerlos más aceptables para el paciente. Los excipientes adecuados para su uso en formas farmacéuticas orales incluyen fosfato dicálcico y diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y alcoholes de polietileno, ya sea con o sin la adición de un tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable. Pueden estar presentes varios materiales diferentes en forma de recubrimientos o para de otro modo modificar la forma física de la forma farmacéutica. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos.

60

65

Los polvos y gránulos dispersables son adecuados para la preparación de una suspensión acuosa. Estos

proporcionan el principio activo (es decir, el al menos un interferidor) mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por aquellos ya mencionados anteriormente. También puede haber presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes descritos anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar también en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como parafina líquida o una mezcla de aceites vegetales. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser (1) gomas de origen natural, tales como goma arábiga y goma de tragacanto, (2) fosfáticas de origen natural, tales como soja y lecitina, (3) ésteres o ésteres parciales procedentes de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán, (4) productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, tal como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco o en un aceite mineral, tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, tal como, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Las suspensiones también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo; uno o más agentes colorantes; uno o más agentes aromatizantes; y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, tales como, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente y un conservante, tal como metil y propil parabenos y agentes aromatizantes y colorantes. Los interferidores de la presente invención también pueden administrarse por vía parenteral, es decir, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraocular, por vía intrasnovial, por vía intramuscular o por vía intraperitoneal, en forma de dosis inyectables del interferidor, preferentemente, en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo líquido, que puede ser un líquido estéril o una mezcla de líquidos, tales como agua, solución salina, solución acuosa de dextrosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, glicerol cetales, tales como 2,2-dimetil-1,1-dioxolano-4-metanol, éteres, tales como poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o, un glicérido de ácido graso o un glicérido de ácido graso acetilado, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, un agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa o un agente emulsionante y otros adyuvantes farmacéuticos.

Son ejemplos ilustrativos de aceites que pueden usarse en las formulaciones parenterales de la presente invención los de petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, vaselina y aceite mineral. Los ácidos grasos adecuados incluyen ácido oleico, ácido esteárico, ácido isoesteárico y ácido mirístico. Los ésteres de ácido graso son, por ejemplo, oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los jabones adecuados incluyen sales de metales alcalinos, amonio y trietanolamina de ácidos grasos y los detergentes adecuados incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, haluros de dimetil dialquilamonio, haluros de alquil piridinio y acetatos de alquilamina; detergentes aniónicos, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicéridos y sulfosuccinatos; detergentes no iónicos, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de poli(oxietileno-oxipropileno) un óxido de etileno u óxido de propileno; y detergentes anfóteros, por ejemplo, alquil-beta-aminopropinatos y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina, así como mezclas.

Las composiciones parenterales de la presente invención contendrán normalmente de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 25% en peso del principio activo en solución. También pueden usarse, ventajosamente, conservantes y tampones. Para minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, dichas composiciones pueden contener un tensioactivo no iónico que tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) preferentemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dicha formulación varía preferentemente de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 15% en peso. El tensioactivo puede ser un solo componente que tiene el HLB anterior o puede ser una mezcla de dos o más componentes que tienen el HLB deseado. Son ejemplos ilustrativos de tensioactivos usados en formulaciones parenterales la clase de ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, por ejemplo, monooleato de sorbitán y los aductos de elevado peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formada por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones acuosas inyectables estériles. Dichas suspensiones pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes que pueden ser una fosfática de origen natural, tal como lecitina, un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno, un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadeca-etilenoacetanol, un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial procedente de un ácido graso y un hexitol, tal

como monooleato de polioxietileno sorbitol o un producto de condensación de un óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán.

La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico, parenteralmente aceptable. Los diluyentes y disolventes que pueden emplearse son, por ejemplo, agua, solución de Ringer, soluciones isotónicas de cloruro de sodio y soluciones isotónicas de glucosa. Además, normalmente se emplean aceites no volátiles estériles como disolventes o medios de suspensión. Para este fin, puede usarse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos, tales como ácido oleico, en la preparación de inyectables.

Una composición de la invención también puede administrarse en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas normales pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son, por ejemplo, manteca de cacao y polietilenglicol.

Otra formulación empleada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de suministro transdérmico ("parches"). Dichos parches transdérmicos también pueden usarse para proporcionar infusión continua o discontinua de los interferidores de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y el uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 5.023.252). Dichos partes pueden construirse para suministro continuo, pulsátil o bajo demanda de agentes farmacéuticos. Las formulaciones de liberación controlada para administración parenteral incluyen formulaciones liposómicas, en microesferas poliméricas y poliméricas en gel que se conocen en la técnica. Puede ser deseable o necesario introducir la composición farmacéutica en el paciente mediante un dispositivo de suministro mecánico. La construcción y el uso de dispositivos de suministro mecánico para el suministro de agentes farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Las técnicas directas para, por ejemplo, administrar un fármaco directamente al cerebro implican normalmente implantar un catéter para suministro de fármacos en el sistema ventricular del paciente para esquivar la barrera hematoencefálica. Uno de dichos sistemas de suministro implantables, usado para el transporte de agentes a regiones anatómicas específicas del organismo, se describe en el documento US 5.011.472.

Las composiciones de la invención también pueden contener otros ingredientes de formulación farmacéuticamente aceptables convencionales, citados generalmente como vehículos o diluyentes, según sea necesario o se desee. Pueden utilizarse procedimientos convencionales para preparar dichas composiciones en formas farmacéuticas adecuadas. Dichos ingredientes y procedimientos incluyen aquellos descritos en las siguientes referencias, cada una de las cuales se incorpora al presente documento por referencia: Powell, M. F. et al., "Compendium of Excipients for Parenteral Formulations" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1998, 52(5), 238-311; Strickley, R.G "Parenteral Formulations of Small Molecule Therapeutics Marketed in the United States (1999)-Part-1" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1999, 53(6), 324-349; y Nema, S. et al., "Excipients and Their Use in Injectable Products" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1997, 51 (4), 166-171.

Los ingredientes farmacéuticos usados comúnmente que pueden usarse como adecuados para formular la composición para su vía de administración prevista incluyen:

- agentes acidificantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido nítrico); agentes alcalinizantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, solución de amoníaco, carbonato de amonio, dietanolamina, monoetanolamina, hidróxido de potasio, borato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, trietanolamina, trolamina); adsorbentes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, celulosa en polvo y carbón activado); propulsores de aerosol (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, dióxido de carbono, CCl₂F₂, F₂ClC-CClF₂ y CClF₃) agentes desplazantes del aire (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, nitrógeno y argón); conservantes antifúngicos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, ácido benzoico, butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio); conservantes antimicrobianos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico y timerosal); antioxidantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio); materiales aglutinantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, polímeros de bloque, goma natural y sintética, poliacrilatos, poliuretanos, siliconas, polisiloxanos y copolímeros de estireno-butadieno); agentes tamponadores (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, metafosfato de sodio, fosfato dipotásico, acetato de sodio, citrato de sodio anhidro y dihidrato de citrato de sodio), agentes portadores (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, jarabe de acacia, jarabe aromático, elixir aromático, jarabe de cereza, jarabe de cacao, jarabe de naranja, jarabe, aceite de maíz, aceite mineral, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, inyección de cloruro de sodio bacteriostático y agua bacteriostática para inyección), agentes quelantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, edetato disódico y ácido edético), colorantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, Rojo FD&C n.º 3, rojo FD&C n.º 20, amarillo FD&C n.º 6, azul FD&C n.º 2, verde D&C n.º 5, naranja D&C n.º 5, rojo D&C n.º 8, caramelo o rojo de óxido de hierro);

- agentes clarificantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, bentonita);
- agentes emulsionantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, goma arábica, cetomacrogol, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lecitina, monooleato de sorbitán, monoestearato de polioxietileno 50);
- agentes encapsulantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, gelatina y ftalato de acetato de celulosa);
- 5 - aromatizantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, aceite de anís, aceite de canela, cacao, mentol, aceite de naranja, aceite de menta y vanillina);
- humectantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, glicerol, propilenglicol y sorbitol);
- agentes de levigación (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, aceite mineral y glicerina);
- aceites (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de oliva,
- 10 - aceite de cacahuete, aceite de sésamo y aceite vegetal);
- bases para pomadas (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, lanolina, pomada hidrófila, pomada de polietilenglicol, vaselina, vaselina hidrófila, pomada blanca, pomada amarilla y pomada de agua de rosas);
- potenciadores de la penetración (suministro transdérmico) (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación monohidroxi o polihidroxi alcoholes, alcoholes mono o polivalentes, alcoholes grasos saturados o insaturados, ésteres grasos saturados o insaturados, ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, aceites esenciales,
- 15 - derivados de fosfatidilo, cefalina, terpenos, amidas, éteres, cetonas y ureas);
- plastificantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, ftalato de dietilo y glicerol);
- disolventes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, etanol, aceite de maíz, aceite de algodón, glicerol, isopropanol, aceite mineral, ácido oleico, aceite de cacahuete, agua purificada, agua para inyección, agua estéril
- 20 - para inyección y agua estéril para irrigación);
- agentes de rigidez (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, alcohol cetílico, ésteres de cetilo, cera, cera microcristalina, parafina, alcohol estearílico, cera blanca y cera amarilla);
- bases para supositorios (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, manteca de cacao y polietilenglicoles (mezclas);
- 25 - tensioactivos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, cloruro de benzalconio, nonoxinol 10, oxtoxinol 9, polisorbato 80, lauril sulfato de sodio y monopalmitato de sorbitán);
- agentes de suspensión (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación agar, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, caolín, metilcelulosa, tragacanto y veegum);
- 30 - agentes edulcorantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, aspartamo, dextrosa, glicerol, manitol, propilenglicol, sacarina sódica, sorbitol y sacarosa);
- antiadherentes para comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio y talco);
- aglutinantes para comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, goma arábica, ácido alginico, carboximetilcelulosa de sodio, azúcar comprimible, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, metilcelulosa, polivinil
- 35 - pirrolidona no reticulada y almidón pregelatinizado);
- diluyentes para comprimidos y cápsulas (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, fosfato de calcio dibásico, caolín, lactosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, carbonato de calcio precipitado, carbonato de sodio, fosfato de sodio, sorbitol y almidón);
- agentes de recubrimiento de comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, glucosa líquida,
- 40 - hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa y goma laca);
- excipientes de compresión directa de comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, fosfato de calcio dibásico);
- disgregantes para comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, ácido alginico,
- 45 - carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, poliacrilina de potasio, polivinilpirrolidona reticulada, alginato de sodio, glicolato sódico de almidón y almidón);
- emolientes para comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, sílice coloidal, almidón de maíz y talco);
- lubricantes para comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, estearato de calcio, estearato de
- 50 - magnesio, aceite mineral, ácido esteárico y estearato de cinc);
- opacificantes para comprimidos/cápsulas (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, dióxido de titanio);
- agentes de pulido de comprimidos (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, cera de carnauba y cera blanca);
- agentes espesantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, cera de abejas, alcohol cetílico y parafina);
- 55 - agentes de tonicidad (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, dextrosa y cloruro de sodio);
- agentes aumentadores de la viscosidad (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, ácido alginico, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio y tragacanto); y
- agentes humectantes (algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, heptadecaetilen oxietanol, lecitinas, monooleato de sorbitol, monooleato de polioxietileno sorbitol y estearato de polioxietileno).

Algunos ejemplos no limitantes de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden ilustrarse del siguiente modo:

- Solución IV estéril: Puede prepararse una solución de 5 mg/ml del interferidor deseado de la presente invención
- 65 - usando agua inyectable estéril y el pH se ajusta en caso necesario. La solución se diluye para su administración a 1 - 2 mg/ml con dextrosa estéril al 5% y se administra en forma de una infusión IV a lo largo de

aproximadamente 60 minutos.

- Polvo liofilizado para administración IV: Puede prepararse una preparación estéril con (i) 100 - 1000 mg del interferidor deseado de la presente invención en forma de un polvo liofilizado, (ii) 32-327 mg/ml de citrato de sodio y (iii) 300 - 3000 mg de Dextran 40. La formulación se reconstituye con suero salino estéril inyectable o dextrosa al 5% hasta una concentración de 10 a 20 mg/ml, que después se diluye con suero salino o dextrosa al 5% hasta 0,2 - 0,4 mg/ml y se administra en forma de bolo IV o mediante infusión IV a lo largo de 15 - 60 minutos.
- Suspensión intramuscular: Puede prepararse la siguiente solución o suspensión, para inyección intramuscular:

50 mg/ml del interferidor deseado insoluble en agua (o soluble en agua) de la presente invención
 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio
 4 mg/ml de TWEEN 80
 9 mg/ml de cloruro de sodio
 9 mg/ml de alcohol bencílico

Cápsulas duras: Se prepara un gran número de cápsulas unitarias rellenando cápsulas de gelatina dura convencionales en dos piezas cada una con 100 mg de principio activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda: Se prepara una mezcla de principio activo en un aceite digerible, tal como aceite de soja, aceite de algodón o aceite de oliva y se inyecta mediante una bomba de desplazamiento positivo al interior de gelatina fundida para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 mg del principio activo. Las cápsulas se lavan y se secan. El principio activo puede disolverse en una mezcla de polietilenglicol, glicerina y sorbitol para preparar una mezcla medicinal miscible en agua.

Comprimidos: Se prepara un gran número de comprimidos por procedimientos convencionales de tal forma que la forma farmacéutica contiene 100 mg de principio activo, 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato de magnesio, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg de almidón y 98,8 mg de lactosa. Pueden aplicarse recubrimientos acuosos y no acuosos adecuados para aumentar la palatabilidad, mejorar la elegancia y la estabilidad o retrasar la absorción.

Comprimidos/cápsulas de liberación inmediata: Estas son formas farmacéuticas sólidas preparadas mediante procesos convencionales y novedosos. Estas unidades se toman por vía oral sin agua para su disolución y suministro de la medicación de manera inmediata. El principio activo se mezcla en un líquido que contiene ingredientes tales como azúcar, gelatina, pectina y edulcorantes. Estos líquidos se solidifican en comprimidos o comprimidos recubiertos mediante técnicas de liofilización y de extracción en estado sólido. Los fármacos interferidores pueden comprimirse con azúcares y polímeros viscoelásticos y termoelásticos o componentes efervescentes para producir matrices porosas previstas para liberación inmediata, sin necesidad de agua.

En una realización particular, los interferidores se formulan en formulaciones parenterales de liberación controlada. Una lista no limitante de dichos sistemas de suministro parenteral de liberación controlada que puede aplicarse para la administración de interferidores incluyen inyecciones a base de aceite, implantes, liposomas, nanopartículas, PEGilación, microesferas y bombas. En una realización particular, las nanopartículas sólidas pueden desarrollarse como sistemas portadores para interferidores. En otra realización particular, los interferidores pueden estar microencapsulados. Las microesferas son polvos de flujo libre, con un diámetro idealmente menor de 125 µm, que pueden suspenderse en vehículos acuosos adecuados para inyección con una jeringuilla convencional usando una aguja del calibre 18 o 20. Los polímeros más prometedores para dicho uso son los copolímeros de lactida/glicólido, poli(orto ésteres) y polianhídridos. El poli (D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA) es un polímero biodegradable que se hidroliza con una reacción catalizada por un ácido o una base para formar los metabolitos naturales de ácido glicólico y ácido láctico. El PLGA está aprobado por la FDA.

De acuerdo con realizaciones particulares, la molécula puede proporcionarse en forma liofilizada con un tampón fisiológico. De acuerdo con realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas, en caso de ser líquidas, se proporcionan a pH fisiológico, en particular entre pH 5 y 9, más en particular entre pH 6 y pH 8.

El término "administración", tal como se usa en el presente documento, tiene el objetivo de poner en contacto las proteínas de interés con las moléculas. Obsérvese que, por ejemplo, en el caso de una enfermedad infecciosa, la administración puede ser a un organismo diferente a aquel en donde deben agregarse las proteínas. La administración intracelular puede ser mediante suministro mediado por vehículo, por ejemplo, mediante vehículos liposómicos o nanopartículas o mediante inyección. En otra realización alternativa más, la molécula agregadora puede entrar en un célula a través de una secuencia que media la penetración celular (o la traslocación celular). En este último caso, la molécula agregadora se modifica adicionalmente mediante acoplamiento recombinante o sintético de una secuencia de penetración celular.

Terapias combinadas

5 En una realización particular, los interferidores de la presente invención pueden administrarse como agente farmacéutico único o en combinación con uno o más agentes farmacéuticos diferentes, donde la combinación no provoca efectos adversos no aceptables. La presente invención también se refiere a dichas combinaciones. Por ejemplo, los interferidores de la presente invención pueden combinarse con agentes antimicrobianos conocidos (por ejemplo, antifúngicos o antibióticos) u otros agentes de indicación y similares, así como con mezclas y combinaciones de los mismos.

10 El término "tratar" o "tratamiento", tal como se indica a lo largo del presente documento se usa de manera convencional, por ejemplo, la gestión o el cuidado de un sujeto con el fin de combatir, aliviar, reducir, mitigar, mejorar el estado de, etc., de una enfermedad o trastorno, tal como un carcinoma. El tratamiento puede aplicarse tanto para enfermedades infecciosas como para trastornos no infecciosos.

15 Dosis y administración:

Basándose en técnicas de laboratorio convencionales conocidas para evaluar los interferidores útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas (tal como se muestra en los ejemplos, en particular, infecciones fúngicas, infecciones bacterianas o infecciones víricas, en particular, infecciones por *Candida albicans*, infecciones por *Staphylococcus sp.* e infecciones por el virus de la gripe), o para el tratamiento de enfermedades no infecciosas (tales como cáncer, AMD e inflamación, tal como se muestra en los ejemplos) mediante pruebas de toxicidad convencionales y mediante ensayos farmacológicos convencionales para determinar el tratamiento de las afecciones identificadas anteriormente en mamíferos y mediante la comparación de estos resultados con los resultados de medicamentos conocidos que se usan para tratar estas afecciones, puede determinarse fácilmente la dosis eficaz de los interferidores de la presente invención para el tratamiento de cada una de las indicaciones deseadas. La cantidad de principio activo que se vaya a administrar en el tratamiento de una de estas afecciones puede variar ampliamente de acuerdo con consideraciones tales como el interferidor concreto y la forma farmacéutica empleada, el modo de administración, el periodo de tratamiento, la edad y el sexo del paciente a tratar y la naturaleza y alcance de la afección tratada.

30 La cantidad total del principio activo que se vaya a administrar variará generalmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal por día y preferentemente, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día. Las pautas posológicas clínicamente útiles variarán de una dosificación de una a tres veces al día hasta una vez cada cuatro semanas. Además, pueden ser beneficiosos los "periodos de descanso farmacológico", en los que no se administra el fármaco a un paciente durante un periodo de tiempo determinado para el equilibrio general entre efecto farmacológico y tolerabilidad. Una forma farmacéutica puede contener de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1500 mg de principio activo y puede administrarse una o más veces al día o menos de una vez al día. La dosis diaria media para administración por inyección, incluyendo inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea y parenteral y el uso de técnicas de infusión será preferentemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. La pauta posológica rectal diaria media será preferentemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. La pauta posológica vaginal diaria media será preferentemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. La pauta posológica tópica diaria media será preferentemente de 0,1 a 200 mg, administrados entre una a cuatro veces al día. La concentración transdérmica será preferentemente la necesaria para mantener una dosis diaria de 0,01 a 200 mg/kg. La pauta posológica inhalatoria diaria media será preferentemente de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal total. Preferentemente, las composiciones para inhalación se presentan para su administración al tracto respiratorio en forma de un polvo rápidamente inhalado por la nariz o un aerosol o solución para un nebulizador o en forma de un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un vehículo inerte, tal como lactosa. En dicho caso, las partículas de interferidor activo tienen de manera adecuada diámetros de menos de 50 micrómetros, preferentemente menos de 10 micrómetros, por ejemplo, entre 1 y 5 micrómetros, tal como entre 2 y 5 micrómetros. Como alternativa, pueden usarse nanopartículas recubiertas, con un tamaño de partícula entre 30 y 500 nm. Una dosis inhalada favorita se encontrará en el intervalo de 0,05 a 2 mg, por ejemplo, de 0,05 a 0,5 mg, de 0,1 a 1 mg o de 0,5 a 2 mg.

55 Resulta evidente para un experto en la materia que la pauta posológica inicial y de continuación para cada paciente variará según la naturaleza y la gravedad de la afección, según se determine por el diagnosticador que lo atienda, la actividad del interferidor específico empleado, la edad y el estado general del paciente, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción del fármaco, combinaciones de fármacos y similares. El modo de tratamiento y el número de dosis deseado de un interferidor de la presente invención o de una sal o éster o composición farmacéuticamente aceptable del mismo puede determinarse por los expertos en la materia usando pruebas de tratamiento convencionales.

60 En ciertas realizaciones, los medicamentos de la invención se administran a la clase de los mamíferos, incluyendo el orden de los carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas), lagomorfos (por ejemplo, conejos) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos).

65 Tal como es práctica común, los compuestos irán acompañados normalmente de instrucciones escritas o impresas

para el uso del tratamiento médico respectivo.

La presente invención también incluye interferidores marcados isotópicamente, que son idénticos a los descritos en el presente documento, salvo por el hecho de que se reemplazan uno o más átomos por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferente a la masa atómica o el número másico normalmente encontrado en la naturaleza. Algunos ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los interferidores de la presente invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Los interferidores de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos interferidores que contienen los isótopos y/u otros isótopos de otros átomos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Ciertos interferidores marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos, tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en ensayos farmacológicos y/o de distribución en sustrato de tejido. Se prefieren particularmente los isótopos de tritio, es decir, ^3H y carbono-14, es decir, ^{14}C , por su facilidad de preparación y detección. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas a consecuencia de su mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida *in vivo* aumentada o requisitos de dosis reducidos y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Los interferidores marcados isotópicamente de fórmula I de la presente invención pueden prepararse normalmente llevando a cabo los procedimientos descritos en los ejemplos más adelante, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible.

Como se ha mencionado, las moléculas pueden aplicarse para tratar enfermedades tanto no infecciosas como infecciosas. De acuerdo con una primera realización, las moléculas de la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades (no infecciosas) (como alternativa, para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades (no infecciosas), tales como cáncer, y enfermedades inflamatorias o un trastorno relacionado con la inmunidad, asociadas con la expresión de una proteína particular (por ejemplo, mediante la sobreexpresión de una proteína particular o la (sobre)expresión de una variante de corte y empalme de una proteína particular o una versión mutante de una proteína particular, la (sobre)expresión de una proteína anclada a la membrana, la (sobre)expresión de una proteína transmembrana (mutante), la (sobre)expresión de una proteína secretada (por ejemplo, una proteasa, un anticuerpo o una citocina presente en la sangre o el plasma), la (sobre)expresión de una proteína en la matriz extracelular (por ejemplo, una metaloproteína de matriz) o una proteína transmembrana (por ejemplo, un receptor de factor de crecimiento). La expresión "expresión aberrante" se refiere a, por ejemplo, la (sobre)expresión de un factor de crecimiento oncogénico en el caso del cáncer, también incluye la expresión de un receptor negativo dominante o un receptor mutante o la aparición de un receptor vertido en la sangre o la expresión (o sobreexpresión) de una citocina o un factor de crecimiento en un fluido corporal. En una realización particular, la "expresión aberrante" se refiere a la presencia no deseada de una proteína modificada postraduccionally o a la presencia no deseada de una proteína modificada no postraduccionally. Las modificaciones postraduccionales alteran las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos modificados y como tales, tienen el potencial de alterar la tendencia a la agregación de un segmento de polipéptido dado, lo que puede aprovecharse para dirigirse específicamente a la forma que tiene la tendencia a la agregación más fuerte. Por lo tanto, en caso de que una modificación postraduccionally reduzca significativamente la tendencia a la agregación de la región de beta agregación, la interferencia será más eficaz con la proteína no modificada. Por el contrario, en caso de haber modificaciones postraduccionales que aumentan la tendencia a la agregación de la región de beta agregación, la interferencia será más eficaz con la proteína modificada. Basándose únicamente en la hidrofobia, se asume que las modificaciones, tales como fosforilación y glucosilación, reducirán la tendencia a la agregación, mientras que el acoplamiento de lípidos aumentará la tendencia a la agregación.

En realizaciones específicas, las moléculas pueden usarse para regular a la baja una proteína (una o más) que necesita ser regulada a la baja en una situación de enfermedad. Dicha proteína es normalmente una proteína cuya sobreexpresión se asocia con y preferentemente causa, la enfermedad (por ejemplo, VEGFR-2 es una proteína cuya sobreexpresión se ha relacionado causalmente con el cáncer y la AMD, EGFR es una proteína cuya sobreexpresión se ha relacionado causalmente con la inflamación). Sin embargo, también puede ser una proteína que solo se exprese en situaciones de enfermedad y normalmente no se expresa en las células/tejido/sujeto diana cuando las células/tejido/sujeto están sanos (por ejemplo, PIGF es una proteína que normalmente no se expresa en tejidos adultos, pero se expresa en tumores). Una proteína que se vaya a regular a la baja también puede ser una proteína que se encuentra normalmente en la misma vía de señalización (normalmente aguas abajo) de una proteína que causa la enfermedad (por ejemplo, un receptor cuando el ligando está asociado con enfermedades), de tal forma que puede detenerse la señal aberrante.

Por consiguiente, la memoria descriptiva describe moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$ para su uso en el tratamiento, la estabilización o la prevención de una enfermedad, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;

- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con dicha enfermedad; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Las enfermedades particularmente previstas que se van a tratar incluyen, pero sin limitación, cáncer, AMD y enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, para su uso en el tratamiento, la estabilización o la prevención del cáncer, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con el cáncer; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

De manera similar, la memoria descriptiva describe moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, para su uso en el tratamiento, la estabilización o la prevención de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con la AMD; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Asimismo, la memoria descriptiva describe moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, para su uso en el tratamiento, la estabilización o la prevención de enfermedades inflamatorias, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con enfermedades inflamatorias; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Más particularmente, la proteína que se va a regular a la baja en el cáncer o la AMD es VEGFR-2. Como alternativa, la proteína que se va a regular a la baja en el cáncer es EGFR2. Las proteínas particulares que pueden regularse a la baja en las enfermedades inflamatorias incluyen TNF- α e IL-1 β .

Tal como se ha mencionado anteriormente, esto equivale a decir que se describen métodos para tratar, estabilizar o prevenir una enfermedad (en particular, cáncer, AMD o enfermedades inflamatorias, respectivamente) en un sujeto que lo necesite, que comprenden: administrar al sujeto una molécula que tiene la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;

P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K y P;

- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con la enfermedad (particularmente cáncer, AMD o enfermedades inflamatorias, respectivamente); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

O, en formato suizo, se describe el uso de moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$ para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la estabilización o la prevención de enfermedades (particularmente cáncer, AMD o enfermedades inflamatorias, respectivamente), en donde:

n es 1 a 5 e i va de 1 a n;

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína cuya expresión o sobreexpresión se asocia con la enfermedad (particularmente cáncer, AMD o enfermedades inflamatorias, respectivamente); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Se incluyen estas tres formulaciones equivalentes para satisfacer los diferentes requisitos nacionales de leyes de patentes.

El sujeto es, en particular, un animal, más particularmente un mamífero (por ejemplo, gato, perro, conejo, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, llama, ratón, rata, ...), más en particular, un ser humano. También se prevén otros sujetos (véanse las definiciones).

Sin embargo, obsérvese que estos métodos también pueden aplicarse a organismos distintos de mamíferos, en particular, para tratar enfermedades en plantas (véase más adelante).

En una realización particular, la molécula interferidora se dirige contra un factor de crecimiento o un receptor de factor de crecimiento o una cinasa receptora transmembrana (por ejemplo, una tirosina cinasa receptora). Una lista de ejemplos no limitantes comprende la proteína PDGF-beta (y pueden usarse interferidores específicos para tratar a un sujeto que tenga un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PDGF-beta, por ejemplo, cánceres de testículos y pulmón), la proteína Erb-B (y pueden usarse interferidores específicos para tratar a un sujeto que tenga un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Erb-B, por ejemplo, cáncer de mama), la proteína VEGF (y pueden usarse interferidores específicos para tratar a un sujeto que tenga expresión no deseada de VEGF, por ejemplo, cánceres de esófago o colon o angiogénesis patológica), la proteína EGFR (y pueden usarse interferidores específicos para tratar a un sujeto que tenga un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de EGFR, por ejemplo, cáncer de mama), la proteína WNT-1 (y pueden usarse interferidores específicos para tratar a un sujeto que tenga expresión no deseada de WNT-1, por ejemplo, carcinoma de células basales), la proteína Her2/neu (y pueden usarse interferidores para tratar a un sujeto que tenga un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Her2/neu, por ejemplo, cáncer de mama), la proteína alfa v-integrina (y pueden usarse interferidores para tratar a un sujeto que tenga un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de alfa v-integrina, por ejemplo, tumores cerebrales o tumores de origen epitelial), la proteína receptora Flt-1 (y pueden usarse interferidores para tratar a un sujeto que tenga un trastorno caracterizado por receptores Flt-1 no deseados, por ejemplo, cáncer y artritis reumatoide). Pueden diseñarse otros ejemplos más de interferidores específicos con especificidad por co-ligandos de integrinas, por ejemplo, VLA4, VCAM, ICAM, selectina o un co-ligando de las mismas, por ejemplo, P-selectina, E-selectina (ELAM), L-selectina o P-selectina glucoproteína (PSGLI), un componente del sistema de complemento, por ejemplo, C3, C5, C3aR, C5aR, convertasa C3, convertasa C5, la función de una quimiocina o un receptor de la misma, por ejemplo, TNF- α , IL-1 α , IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-8, TNFR1, TNFR2, IgE, SCYA11 o CCR3, un componente de un canal iónico, un componente de un receptor acoplado a proteína G o con la función de un receptor de neurotransmisores o un ligando del mismo.

De acuerdo con otro aspecto, algunas aplicaciones médicas particularmente previstas son el uso de las moléculas proporcionadas en el presente documento como medicamento en enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, la memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 5 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo patógeno;
- 10 y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

para su uso como fármaco anti-patógeno (o antiinfeccioso).

15 De acuerdo con una realización particular, las moléculas se usan como agentes antimicrobianos. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- 20 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se
- 25 seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo microbiano; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

30 para su uso como antimicrobiano.

Por lo tanto, se contempla el uso de interferidores para el tratamiento de infecciones por patógenos bacterianos en animales y seres humanos, por patógenos fúngicos en animales y seres humanos y por patógenos parasíticos en animales y seres humanos. Puede encontrarse una lista no excluyente de patógenos animales y humanos en la

35 tabla 1A de la Patente de los Estados Unidos 8.088.888 (que comienza en la página 8 y termina en la página 15). Puede encontrarse una lista no excluyente de patógenos animales y fúngicos en la tabla 1B de la Patente de los Estados Unidos 8.088.888 (que comienza en la página 15 y termina en la página 18). Puede encontrarse una lista no excluyente de patógenos parasíticos de animales y humanos en la tabla 1C de la Patente de los Estados Unidos 8.088.888 (que comienza en la página 18 y termina en la página 20). Las tablas 1A, 1B y 1C de la Patente de los

40 Estados Unidos 8.088.000 se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

De acuerdo con otra realización particular, las moléculas se usan como agentes antivíricos. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 45 - n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se
- 50 seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo vírico; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

55 para su uso como antivírico.

Otra formulación equivalente es que se proporciona el uso de estas moléculas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por patógenos (o una infección microbiana o vírica, respectivamente), es decir, una reivindicación de tipo suizo.

60

Esto también equivale a decir que se describen métodos para prevenir o tratar infecciones por patógenos en un sujeto que lo necesite, que comprenden:

administrar al sujeto una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 65 - n es 1 a 5 e i va de 1 a n;

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un patógeno; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

O, en el caso de antimicrobianos, es equivalente a métodos descritos para tratar infecciones microbianas en un sujeto que lo necesite, que comprenden:

administrar al sujeto una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo microbiano; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

O, en el caso de antivíricos, es equivalente a métodos descritos para tratar infecciones víricas en un sujeto que lo necesite, que comprenden:

administrar al sujeto una molécula que tiene la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo vírico; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Algunas etapas adicionales de los métodos pueden incluir la evaluación (o la medición) de la presencia del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano, vírico) (por ejemplo, el control del crecimiento, la reproducción o la supervivencia del organismo patógeno).

"Organismo microbiano", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a bacterias, tales como bacterias grampositivas (por ejemplo, cocos, tales como *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., bacilos, tales como *Bacillus* sp.), bacterias gramnegativas (por ejemplo, *Escherichia* sp., *Yersinia* sp.), espiroquetas (por ejemplo, *Treponema* sp, tales como *Treponema pallidum*, *Leptospira* sp., *Borrelia* sp., tales como *Borrelia burgdorferi*), mollicutes (es decir, bacterias sin pared celular, tales como *Mycoplasma* sp.), bacterias resistentes a ácidos (por ejemplo, *Mycobacterium* sp., tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia* sp.). Los "organismos microbacterianos" también abarcan hongos (tales como levaduras y mohos, por ejemplo, *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Coccidioides* sp., *Cryptococcus* sp., *Histoplasma* sp., *Pneumocystis* sp. o *Trichophyton* sp.), protozoos (por ejemplo, *Plasmodium* sp., *Entamoeba* sp., *Giardia* sp., *Toxoplasma* sp., *Cryptosporidium* sp., *Trichomonas* sp., *Leishmania* sp., *Trypanosoma* sp.) y arqueas. De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína de un organismo microbiano es una proteína de un organismo microbiano seleccionado entre bacterias, hongos o protozoos. Más particularmente, la proteína es de bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias, mollicutes, protozoos u hongos. Más particularmente, es una proteína de bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias u hongos, tales como levaduras y mohos.

"Organismo vírico" o "virus", que se usan como equivalentes en el presente documento, son agentes infecciosos pequeños que pueden replicarse únicamente dentro de las células vivas de los organismos. Estos incluyen virus de ADNbc (por ejemplo, adenovirus, herpesvirus, poxvirus), virus de ADNmc (por ejemplo, parvovirus), virus de ARNbc (por ejemplo, reovirus), virus de ARNbc(+) (por ejemplo, picornavirus, togavirus), virus de ARNbc(-) (por ejemplo, ortomixovirus, rbdovirus), virus de ARNbc-RT (retrotranscripción), es decir, virus con ARN en sentido (+) con un intermedio de ADN en el ciclo vital (por ejemplo, retrovirus) y virus de ADNbc-RT (por ejemplo, hepadnavirus). Los

bacteriófagos (o de forma abreviada, fagos) son una clase particular de virus, que son virus que infectan a bacterias e inyectan su material genético (ARNmc, ARNbc, ADNmc o ADNbc). Los fagos son particularmente abundantes en el agua de mar y muchas bacterias marinas se infectan con fagos. Los bacteriófagos podrían representar un problema en procesos industriales en los que se usan bacterias (por ejemplo, en la producción de alimentos, tales como yogur, queso y similares).

En los métodos dirigidos al tratamiento de una infección vírica o a la inhibición de la infectividad vírica en un animal no humano, el virus animal se selecciona preferentemente de entre un picornavirus, tal como un enterovirus bovino, un enterovirus B porcino, un virus de la fiebre aftosa, un virus de la rinitis equina A, un virus de la rinitis bovina B, un virus Ijungan, virus de la rinitis equina B, un virus aichi, un kobuvirus bovino, un tescovirus porcino, un sapelovirus porcino, un sapelovirus de simio, un sapelovirus aviar, un virus de la encefalomielititis aviar, un virus de la hepatitis A de patos o un enterovirus A de simio; un pestivirus, tal como el virus de la enfermedad de la frontera, un virus de la diarrea bovina o un virus de la fiebre porcina clásica; un arterivirus, tal como un virus de la arteritis equina, un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, un virus elevador de lactato deshidrogenasa o un virus de la fiebre hemorrágica de simios; un coronavirus, tal como un coronavirus bovino, un coronavirus porcino, un coronavirus felino o un coronavirus canino; un paramixovirus, tal como un virus de hendra, un virus de nipah, un virus del moquillo canino, un virus de la peste bovina, un virus de la enfermedad de Newcastle y un virus sincitial respiratorio bovino; un ortomixovirus, tal como un virus de la gripe A, un virus de la gripe B o un virus de la gripe C; un reovirus, tal como un virus de la lengua azul; un circovirus porcino, un herpesvirus, tal como un virus de la seudorrabia o un herpesvirus 1 bovino; un asfavirus, tal como un virus de la fiebre porcina africana; un retrovirus, tal como un virus de la inmunodeficiencia de simios, un virus de la inmunodeficiencia felina, un virus de la inmunodeficiencia bovina, un virus de la leucemia bovina, un virus de la leucemia felina, un retrovirus de ovejas Jaagsiekte o un virus de la artritis-encefalitis caprina; un flavivirus, tal como el virus de la fiebre amarilla, un virus del Nilo occidental, un virus de la fiebre del dengue, un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas o un virus de la diarrea bovina; o un rabdovirus, tal como un virus de la rabia.

En los métodos dirigidos al tratamiento de una infección vírica o a la inhibición de la infectividad vírica en un ser humano, el virus humano se selecciona preferentemente de entre un adenovirus, un astrovirus, un hepadnavirus, un herpesvirus, un papovavirus, un poxvirus, un arenavirus, un bunivirus, un calcivirus, un coronavirus, un filovirus, un flavivirus, un ortomixovirus, un paramixovirus, un picornavirus, un reovirus, un retrovirus, un rabdovirus o un togavirus. En realizaciones preferidas, el adenovirus incluye, pero sin limitación, un adenovirus humano. En realizaciones preferidas, el astrovirus incluye, pero sin limitación, un mamastrovirus. En realizaciones preferidas, el hepadnavirus incluye, pero sin limitación, el virus de la hepatitis B. En realizaciones preferidas, el herpesvirus incluye, pero sin limitación, el virus del herpes simple de tipo I, el virus del herpes simple de tipo 2, un citomegalovirus humano, un virus de Epstein-Barr, un virus varicela zóster, un roseolovirus y un herpesvirus asociado con el sarcoma de Kaposi. En realizaciones preferidas, el papovavirus incluye, pero sin limitación, el virus del papiloma humano y un virus de polioma humano. En realizaciones preferidas, el poxvirus incluye, pero sin limitación, un virus variola, un virus vaccinia, un virus de la viruela bovina, un virus de la viruela de mono, un virus de la viruela, un virus de la seudovaricela bovina, un virus de la estomatitis papular, un virus tanapox, un virus del tumor del mono de yaba y un virus del molusco contagioso. En realizaciones preferidas, el arenavirus incluye, pero sin limitación, el virus de la coriomeningitis linfocítica, un virus de lassa, un virus de machupo y un virus de junin. En realizaciones preferidas, el bunivirus incluye, pero sin limitación, un virus de hanta, un nairovirus, un ortobunivirus y un flebovirus. En realizaciones preferidas, el calcivirus incluye, pero sin limitación, un vesivirus, un norovirus, tal como el virus de Norwalk y un sapovirus. En realizaciones preferidas, el coronavirus incluye, pero sin limitación, un coronavirus humano (agente etiológico del síndrome respiratorio agudo severo (SARS, por sus siglas en inglés)). En realizaciones preferidas, el filovirus incluye, pero sin limitación, un virus del Ébola y un virus de Marburgo. En realizaciones preferidas, el flavivirus incluye, pero sin limitación, un virus de la fiebre amarilla, un virus del Nilo occidental, un virus de la fiebre del dengue, un virus de la hepatitis C, un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un virus de la encefalitis japonesa, un virus de la encefalitis del valle de Murray, un virus de la encefalitis de St. Louis, un virus de la encefalitis vernoestival rusa, un virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, un virus de la diarrea vírica bovina, un virus de la enfermedad del bosque de Kyasanus y un virus de la encefalitis de Powassan. En realizaciones preferidas, el ortomixovirus incluye, pero sin limitación, virus de la gripe de tipo A, virus de la gripe de tipo B y virus de la gripe de tipo C. En realizaciones preferidas, el paramixovirus incluye, pero sin limitación, un virus parainfluenza, un rubulavirus (paperas), un morbilivirus (sarampión), un pneumovirus, tal como un virus sincitial respiratorio humano y un virus de la panencefalitis esclerosante subaguda. En realizaciones preferidas, el picornavirus incluye, pero sin limitación, un poliovirus, un rinovirus, un virus coxackie A, un virus coxackie B, un virus de la hepatitis A, un ecovirus y un enterovirus. En realizaciones preferidas, el reovirus incluye, pero sin limitación, un virus de la fiebre por garrapatas de Colorado y un rotavirus. En realizaciones preferidas, el retrovirus incluye, pero sin limitación, un lentivirus, tal como un virus de la inmunodeficiencia humana y un virus linfotrófico T humano (HTLV). En realizaciones preferidas, el rabdovirus incluye, pero sin limitación, un lisavirus, tal como el virus de la rabia, el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa. En realizaciones preferidas, el togavirus incluye, pero sin limitación, un alfavirus, tal como un virus del río Ross, un virus de O'nyong'nyong, un virus de Sindbis, un virus de la encefalitis equina venezolana, un virus de la encefalitis equina oriental y un virus de la encefalitis equina occidental y un virus de la rubéola.

De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína de un organismo patógeno es una proteína de un patógeno,

cepa o variante resistente a fármacos. Se sabe que la resistencia a fármacos surge en varios patógenos, particularmente en virus y microorganismos.

5 Un ejemplo particular de resistencia a fármacos es la resistencia a los antibióticos, por lo tanto, de acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la proteína de un organismo microbiano es una proteína de un organismo, cepa o variante resistente a los antibióticos o que también se produce en un organismo resistente a los antibióticos. Véase también la sección de ejemplos. Debido a que las presentes moléculas tienen un mecanismo de acción completamente diferente al de los antibióticos conocidos (es decir, agregan una proteína diana del organismo microbiano), se prevé que los organismos resistentes a antibióticos no sean resistentes a estas moléculas. Además, 10 ya que la mayor parte de las regiones hidrófobas de las proteínas se encuentran en partes conservadas de la proteína, se prevé que la resistencia antibiótica (o la resistencia antimicrobiana) se desarrollará más lentamente contra estas moléculas que contra los antibióticos convencionales. De hecho, de acuerdo con realizaciones particulares, los métodos comprenden la administración prolongada de las moléculas sin un aumento significativo en los valores de CIM. Por lo tanto, se proporcionan métodos de administración, en donde se administran las moléculas como se describen en el presente documento al menos una vez al día durante al menos diez días o al menos una vez al día durante catorce días. En particular, este régimen de tratamiento no va acompañado del desarrollo de resistencia a antibióticos. Por lo tanto, estas realizaciones prevén que los valores de CIM a lo largo de este intervalo en el tiempo no aumentan más de cuatro veces o no se duplican. Más particularmente, se prevé que, durante una administración prolongada, el valor de CIM de la molécula interferidora para el organismo microbiano específico 20 permanezca por debajo del punto de corte clínico de la molécula interferidora para el organismo microbiano específico.

De acuerdo con realizaciones específicas, las moléculas pueden usarse para eliminar el organismo patógeno (por ejemplo, microbiano) o los métodos dan como resultado la eliminación del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano). De acuerdo con otras realizaciones específicas adicionales, las moléculas tienen éxito en eliminar rápidamente el organismo patógeno (microbiano), en particular, en una hora o menos o en 30 minutos o menos. Un rápido efecto bactericida (o un rápido efecto de eliminación de microorganismos) no solo proporciona mejores resultados clínicos, incluso en monoterapia (Finch et al, *Antimicrob Agents Chemother*; 46(6):1746-54, 2002), sino que también puede acortar la duración de la terapia antimicrobiana y la duración del ingreso hospitalario, así como 30 contribuir a la reducción en el desarrollo de resistencia. Esto se demostró, por ejemplo, para los antibióticos de fluoroquinolona de rápida eliminación (Albertson et al., *Int J Clin Pract.*;64(3):378-88, 2010).

De acuerdo con realizaciones alternativas, los métodos que usan las moléculas inhiben el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano o vírico) sin eliminarlo. 35

De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína del organismo microbiano es una proteína esencial, es decir, el organismo no puede sobrevivir si está desprovisto de la proteína. De acuerdo con otras realizaciones particulares (no excluyentes), la proteína del organismo microbiano está implicada en la formación de biofilms. La formación de biofilms es un fenómeno bien caracterizado y se han identificado y/o caracterizado numerosas proteínas implicadas 40 en la formación de biofilms, algo de lo que será consciente un experto en la materia. Estas proteínas pueden diferir entre las especies microbianas (o pueden ser homólogas, pero tener un nombre diferente). Algunos ejemplos de dichas proteínas incluyen, pero sin limitación, Hwp1, la familia de proteínas Als (en particular, en *C. albicans*), proteínas codificadas por la familia de genes EPA, la familia de genes AWP1-4 y el gen PWP (en particular, en *C. glabrata*), en proteínas de *Yersinia* codificadas por los genes hmsHFRS, gmhA, yrbH, waaAE-coaD, hmsT, hmsP, speA, speC, nghA, rcsA, rcsC, rcsDB, phoPQ (véase la tabla 1 de Zhou y Yang, *Protein Cell* 2011), en proteínas de *Staphylococcus* codificadas por los genes icaADBC, icaR, sar, agr, rbf, sigma(B). 45

De acuerdo con realizaciones adicionales, se proporcionan métodos para tratar o prevenir la formación de biofilms, en donde la proteína del organismo microbiano está implicada en la formación de biofilms. De acuerdo con otras realizaciones adicionales, la formación del biofilm es sobre un objeto, en particular, un dispositivo implantable, tal como un catéter o un estent. 50

Por lo tanto, la memoria descriptiva describe métodos para prevenir, inhibir o revertir el crecimiento de biofilms microbianos sobre una superficie, que comprenden poner en contacto la superficie con una molécula de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde: 55

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P; 60
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; en donde al menos una Y_i es una serie presente en una proteína de un organismo microbiano; y 65
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Más particularmente, la proteína del organismo microbiano es una proteína implicada en la formación de biofilms. La superficie sobre la que se previene, inhibe o revierte la formación del biofilm puede ser una superficie biótica o abiótica. En particular, la superficie puede encontrarse sobre o dentro del organismo del sujeto, ya sea propia del organismo o de un objeto exógeno dentro del organismo, tal como de un dispositivo implantado.

Aunque se prevé principalmente prevenir o tratar infecciones microbianas en sujetos, cabe destacar que las moléculas podrían usarse como agente antimicrobiano para prevenir o remediar la presencia de microorganismos (patógenos) sobre superficies u objetos también fuera del organismo del sujeto. La presente solicitud está prevista principalmente para el recubrimiento de materiales de alto valor o estériles, por ejemplo, materiales usados para dispositivos implantables. Por consiguiente, se proporcionan métodos para prevenir, inhibir o revertir el crecimiento de biofilms microbianos sobre una superficie de un dispositivo implantable, tal como un catéter o un estent.

Por consiguiente, también se prevén dispositivos recubiertos dentro del ámbito de la invención. El recubrimiento de los dispositivos puede efectuarse directamente, aplicando las moléculas al dispositivo. Como alternativa, pueden recubrirse sobre el dispositivo usando enlazadores (reticulantes). Los dispositivos pueden estar completamente recubiertos (por ejemplo, mediante inmersión del dispositivo en una solución de las molécula) o pueden recubrirse solo partes del dispositivo. Se prevé particularmente que los dispositivos estén recubiertos con moléculas contra una proteína presente en un organismo microbiano, en particular, una proteína implicada en la formación de biofilms. Sin embargo, también se prevé que los dispositivos se recubran con moléculas dirigidas contra otras proteínas (o con moléculas que sean biespecíficas y se dirijan a una proteína de un organismo microbiano y otra proteína por medio de restos Y_i diferentes). Por ejemplo, el implante de dispositivos a menudo puede causar reacciones inmunitarias adversas localizadas. Estas pueden contrarrestarse recubriendo al menos una parte del dispositivo con moléculas dirigidas contra proteínas implicadas en estas reacciones inmunitarias (o, por ejemplo, con moléculas biespecíficas contra las dos diferentes proteínas). A modo de otro ejemplo, para contrarrestar la infección conjunta (en particular, formadora de biofilms) de hongos y bacterias, puede recubrirse al menos una parte del dispositivo con moléculas dirigidas contra proteínas fúngicas y otra parte con moléculas dirigidas contra proteínas bacterianas (o con moléculas que son (al menos bi)específicas para una proteína fúngica y una proteína bacteriana).

Por lo tanto, la memoria descriptiva describe dispositivos (en particular, dispositivos implantables) que están al menos parcialmente recubiertos con moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

Más particularmente, al menos una Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo microbiano, específicamente, una proteína implicada en la formación de biofilms.

Métodos de selección

De acuerdo con un aspecto adicional, se proporcionan métodos para seleccionar nuevos compuestos en líneas celulares (incluyendo, pero sin limitación, líneas celulares humanas, de mamífero, de insecto y vegetales), patógenos u organismos microbianos. Estos métodos permiten una rápida identificación de compuestos que tienen efecto en el crecimiento, la reproducción o la supervivencia de la línea celular u organismo que se esté estudiando o de compuestos que inhiben la función de proteínas y/o que agregan proteínas en dicha línea celular o proteína, incluso sin conocer previamente la diana. Ya que la regulación a la baja por agregación es específica de secuencia, no obstante, la secuencia de los compuestos de trabajo permitirá una rápida identificación de la diana. Por lo tanto, no solo pueden obtenerse nuevos compuestos usados estos métodos de selección, sino que también permiten la identificación de nuevas dianas farmacológicas. Por este motivo, también puede ser particularmente interesante usar líneas celulares que sirven como modelo de enfermedad (tales como, por ejemplo, líneas celulares de cáncer o incluso células aisladas directamente de un tumor).

La memoria descriptiva describe métodos de selección que comprenden las etapas de:

- a) identificar en al menos una proteína al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P,

R, K, D o E;

b) sintetizar al menos una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 5 - n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre R, K y P;
 - 10 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en la al menos una proteína identificada en la etapa a); y
 - 15 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;
- c) añadir la al menos una molécula preparada en la etapa b) a la proteína de la etapa a); y
d) evaluar la función y/o la agregación de la proteína.

20 En particular, los métodos de selección se llevarán a cabo en sistemas celulares o directamente sobre patógenos. La memoria descriptiva describe dichos métodos que incluyen las etapas de:

25 a) identificar en al menos una proteína de la línea celular, el patógeno o el organismo microbiano al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

b) sintetizar al menos una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 30 - n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre R, K y P;
- 35 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en la al menos una proteína de la línea celular, el patógeno o el organismo microbiano identificada en la etapa a); y
- 40 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

c) añadir la al menos una molécula preparada en la etapa b) a la línea celular, patógeno u organismo microbiano en cuyo genoma se codifica la proteína de la etapa a); y

45 d) evaluar la supervivencia y/o el crecimiento o la reproducción de la línea celular, el patógeno o el organismo microbiano.

50 Como se ha mencionado anteriormente, si se desea, los métodos pueden comprender además una etapa de correlacionar la secuencia Y_i de una molécula (sintetizada en la etapa b) que afecta a la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción de la línea celular, el patógeno o el organismo microbiano con una proteína identificada en la etapa a) para identificar la proteína diana. Sin embargo, esta etapa de correlación no es necesaria - para compuestos antipatógenos, puede ser más importante que tenga éxito para inhibir la supervivencia, la reproducción o el crecimiento del patógeno que saber la proteína diana exacta.

55 Ya que la inhibición de la supervivencia, el crecimiento o la reproducción del organismo diana se prevé principalmente para organismos patógenos (por ejemplo, organismos microbianos o víricos), estos métodos son particularmente adecuados para seleccionar nuevos compuestos antipatógenos (por ejemplo, antimicrobianos o antivíricos).

60 Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones específicas, se proporcionan métodos para seleccionar nuevos compuestos antipatógenos. La memoria descriptiva describe dichos métodos que comprenden las etapas de:

65 a) identificar en al menos una proteína de un patógeno al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

b) sintetizar al menos una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo patógeno identificado en la etapa a); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

c) añadir la al menos una molécula preparada en la etapa b) al organismo patógeno en cuyo genoma se codifica la proteína de la etapa a); y

d) evaluar la supervivencia y/o el crecimiento o la reproducción del organismo patógeno.

De acuerdo con realizaciones específicas, se proporcionan métodos para seleccionar nuevos compuestos antimicrobianos. La memoria descriptiva describe dichos métodos que comprenden las etapas de:

a) identificar en al menos una proteína microbiana al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

b) sintetizar al menos una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo microbiano identificado en la etapa a); y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

c) añadir la al menos una molécula preparada en la etapa b) al organismo microbiano en cuyo genoma se codifica la proteína de la etapa a); y

d) evaluar la supervivencia y/o el crecimiento o la reproducción del organismo microbiano.

Al evaluar la supervivencia, pueden determinarse los valores de CIM. Para identificar un compuesto con actividad antimicrobiana, es decir, para clasificar una molécula como un acierto, la CIM debe ser, en particular, menor de 100 $\mu\text{g/ml}$, más en particular, menor de 50 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ o más en particular, menor de 10 $\mu\text{g/ml}$ (tal como, por ejemplo, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ o 1 $\mu\text{g/ml}$).

Aunque los valores de CIM normalmente se expresan en $\mu\text{g/ml}$, cabe destacar que el peso molecular de los compuestos es de media significativamente mayor que el de los compuestos antibióticos clásicos. De hecho, mientras que un antibiótico tiene normalmente una masa molecular en el intervalo de 200-700 Dalton, debido a la presencia de aminoácidos en al menos los restos X e Y, y debido al hecho de que puede haber más de una "unidad" presente en las moléculas (es decir, n puede ser mayor de uno), el peso molecular será normalmente (mucho) mayor de 1000 Dalton. Como resultado, una concentración molar similar proporcionará masas moleculares mucho mayores y por tanto, valores de CIM mucho mayores. En otras palabras, para determinar el efecto antimicrobiano eficaz, puede ser interesante calcular el equivalente molar de los valores en $\mu\text{g/ml}$ (y, por ejemplo, comparar estos con valores molares para otros antibióticos).

De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, se proporcionan métodos para seleccionar nuevos compuestos antivíricos. La memoria descriptiva describe dichos métodos que comprenden las etapas de:

a) identificar en al menos una proteína vírica al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente

ningún resto de P, R, K, D o E;

b) sintetizar al menos una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P, lo más particularmente seleccionado de entre R, D y P;

- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo vírico identificado en la etapa a); y

- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

c) añadir la al menos una molécula preparada en la etapa b) al organismo vírico en cuyo genoma se codifica la proteína de la etapa a); y

d) evaluar la supervivencia y/o el crecimiento o la reproducción del organismo vírico.

Típicamente, para virus, la supervivencia puede medirse de manera indirecta evaluando el efecto (por ejemplo, supervivencia) en células infectadas. También puede aplicarse este método indirecto para otros organismos patógenos. Sin embargo, normalmente se prefieren métodos directos, ya que son más cuantitativos. Para virus, puede determinarse el título vírico. Como alternativa, puede establecerse un sistema de minirreplíción en el que solo están presentes proteínas víricas específicas y donde una proteína indicadora es una indicación del efecto en la reproducción o "supervivencia" del virus.

Cabe destacar que, aunque los métodos de selección se describen en el presente documento como métodos para identificar nuevos compuestos antipatógenos, el experto en la materia apreciará fácilmente que estos métodos también pueden usarse para identificar nuevos compuestos dirigidos contra proteínas no patogénicas para seleccionar el compuesto más eficaz. Por ejemplo, las moléculas previstas para tratar una enfermedad mediante la regulación a la baja de una proteína pueden seleccionarse en primer lugar respecto de su eficacia en un modelo celular o animal con una lectura adecuada (a condición de que la conservación de secuencia de la región correspondiente a la al menos una serie Y_i sea suficiente para usar el mismo compuesto en el modelo celular o animal y el organismo al que deba administrarse el compuesto). Esto puede efectuarse, por ejemplo, para proteínas que contienen diferentes regiones de beta-agregación o para identificar la mejor combinación de regiones de beta-agregación.

De hecho, de manera similar a los métodos de selección para moléculas que afectan al crecimiento, la reproducción y/o la supervivencia de organismos patógenos (y que como consecuencia, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas), los métodos pueden usarse para seleccionar moléculas que pueden usarse en enfermedades no infecciosas. Los métodos pueden usarse para identificar el compuesto más eficaz frente a una diana conocida (por ejemplo, seleccionando en una línea celular que tiene un indicador unido vinculado con la actividad de la diana o que depende de la presencia de la diana para su supervivencia) o para identificar nuevas dianas. Esto último es particularmente cierto para aplicaciones donde la lectura puede ser la muerte celular, ya que no dependen de un ensayo indicador. Sin embargo, los métodos pueden usarse para identificar nuevas dianas en una vía para la que también hay disponible un ensayo indicador.

Los métodos de selección presentados en el presente documento proporcionan ventajas considerables frente a los métodos de selección existentes. Por un lado, no son selecciones aleatorias y por lo tanto, tienen más probabilidades de proporcionar compuestos exitosos. Por otro lado, no requieren tener disponibles estructuras 3D de las proteínas diana para una selección eficaz, ya que el direccionamiento está enteramente basado en la secuencia. Se sabe que la identificación de nuevas dianas es un problema particular para antimicrobianos o antibióticos.

Para asegurarse de que el compuesto identificado es eficaz y no tiene efectos secundarios, debe probarse la toxicidad del compuesto, en particular en vertebrados, lo más particularmente, en sistemas de mamíferos. Además, para evitar dirigirse a proteínas no relevantes (por ejemplo, proteínas no microbianas en caso de que se identifique una nueva molécula antibiótica), debe probarse la reactividad cruzada. Esto puede efectuarse en primera instancia fácilmente comparando la secuencia identificada en la etapa a) con secuencias de organismos/especies a las cuales se va a administrar el compuesto (por ejemplo, compuesto antimicrobiano o antivírico), por ejemplo, mediante programas de alineamiento de secuencias, tales como BLAST. Para moléculas dirigidas contra patógenos (que se van a usar en aplicaciones antiinfecciosas), se prevé particularmente que los uno o más restos Y_i que son idénticos a series en proteínas de patógenos (por ejemplo, microbianas) presentes en las moléculas no estén codificadas en el genoma del organismo/sujeto (normalmente mamífero, en particular, ser humano) al que se administran las moléculas.

En las realizaciones que abarcan métodos para identificar nuevas dianas para compuestos antipatógenos (por ejemplo, antimicrobianos), se prevé particularmente que la proteína del patógeno (por ejemplo, microbiana) en la

etapa a) no sea una diana conocida para fármacos (por ejemplo, antibióticos). Esto hará que los compuestos identificados sean particularmente útiles en terapia combinada, ya que se abordan diferentes dianas. Además, en caso de que la diana no sea una diana conocida para fármacos (tales como antibióticos), aún no se ha desarrollado resistencia farmacológica (a antibióticos).

5 Otra ventaja particular es que los métodos de selección pueden llevarse a cabo sin sesgo de selección para una proteína particular como diana de interés. De hecho, puede analizarse el proteoma completo del organismo (o línea celular) y pueden usarse las secuencias adecuadas en moléculas descritas en el presente documento y comprobarse su eficacia. Esto tiene altas probabilidades de proporcionar nuevas dianas. Además, cuando se efectúa
10 dicho análisis, en particular para aplicaciones antipatógenos, se prevé que las regiones identificadas en la etapa a) sean regiones que aparecen más de una vez en el proteoma. Más particularmente, la al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos identificada en la etapa a) aparece en más de una proteína del organismo patógeno (por ejemplo, microbiano o vírico).

15 De hecho, cuando se afronta una infección, en muchos casos, es deseable usar como diana más de un organismo patógeno. Esto es evidente, por ejemplo, en infecciones con organismos microbianos, donde normalmente se usan antimicrobianos de amplio espectro. Esto permite combatir la infección incluso sin saber la identidad concreta del organismo infeccioso. En los presentes métodos, también puede asegurarse que la al menos una región de 4 a 16 aminoácidos contiguos identificada en la etapa a) se produce en una proteína o en al menos una proteína, de más
20 de un organismo microbiano.

Más particularmente, los organismos microbianos usados como diana en el presente documento son organismos microbianos patógenos. Para asegurarse de que no se eliminan organismos microbianos beneficiosos (por ejemplo, microorganismos beneficiosos en la flora intestinal de un sujeto), puede comprobarse si la serie identificada en el
25 organismo microbiano es específica para organismos patógenos y no aparece en microorganismos beneficiosos.

Aislamiento, eliminación, detección y diagnóstico

30 La memoria descriptiva describe un método para aislar una proteína específica de una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una molécula interferidora y aislar el complejo co-agregado de interferidor-proteína resultante de dicha muestra. Es decir, la molécula interferidora actúa como agente de unión que captura la proteína diana. Esto puede usarse en todos los campos donde sea necesaria la detección (por ejemplo, en biotecnología blanca para medir niveles de contaminantes, en biotecnología roja o verde para medir, por ejemplo, niveles de biomarcadores o metabolitos, etc.).

35 El método para el aislamiento de una proteína específica de una muestra puede comprender además la separación de dicha al menos una proteína de la muestra. Una aplicación de la separación de al menos una proteína de una muestra es la retirada (o eliminación) de proteínas altamente abundantes de una muestra. De hecho, un gran problema en el descubrimiento y validación de dianas proteicas es cómo analizar exhaustivamente muestras de
40 proteínas complejas (por ejemplo, plasma, orina, fluido cefalorraquídeo) y medir dianas traza (es decir, dianas muy poco abundantes). Típicamente, las proteínas abundantes tienen a menudo una concentración 6-10 órdenes de magnitud mayor que la de las proteínas poco abundantes. Por lo tanto, en ciertas ocasiones, deben eliminarse las proteínas altamente abundantes para detectar y medir proteínas traza de importancia médica. Ya que la albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina suponen hasta aproximadamente un 90% del contenido total de
45 proteína en suero humano, existe una necesidad crítica de herramientas de diagnóstico para eliminar rápidamente estas proteínas abundantes no deseadas y desenmascarar las menos abundantes, los biomarcadores proteicos de bajo peso molecular. En la actualidad se usan en la técnica varios métodos: 1) inmunoglobulina G (IgG) como reactivos de afinidad para capturar y separar proteínas diana abundantes, 2) inmunoglobulina de yema de huevo (IgY), que son anticuerpos similares a IgG aislados de la yema de huevo de aves inmunizadas, 3) se usa
50 prefraccionamiento para separar una mezcla de proteínas en diferentes fracciones para retirar ciertas proteínas en la mezcla original y 4) la proteína A y la proteína G son proteínas de la pared celular bacteriana con especificidad por los anticuerpos IgG, por lo tanto, las resinas de afinidad de proteína A y G posibilitan la eliminación de IgG y 5) microperlas de IgG e IgY se usan para la detección de proteínas.

55 El método para el aislamiento de al menos una proteína puede comprender además la detección de al menos una proteína en dicho complejo de molécula-proteína. La detección puede llevarse a cabo separando los complejos de molécula interferidora-proteína diana mediante, por ejemplo, electroforesis, cromatografía en columna, filtración, atracción electrostática, atracción magnética o paramagnética, espectrometría de masas y similares.

60 De acuerdo con un aspecto adicional, las moléculas interferidoras, tal como se definen adicionalmente en las reivindicaciones, se usan en la detección o como agentes diagnósticos. Por lo tanto, las moléculas interferidoras, tal como se definen adicionalmente en las reivindicaciones, pueden usarse en un método de diagnóstico. Por consiguiente, se proporcionan métodos de detección y de diagnóstico.

65 La memoria descriptiva describe métodos para detectar una proteína en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener la proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en la proteína que se vaya a detectar; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

b) detectar la presencia de moléculas que han reaccionado con la proteína.

La muestra puede proporcionarse tal cual o puede procesarse previamente. Las "moléculas que han reaccionado con la proteína" en la etapa b) prevé tanto moléculas que están reaccionando con la proteína (es decir, detección en tiempo real) como moléculas que han reaccionado con la proteína. Estas moléculas pueden seguir en contacto con la proteína o pueden no estar ya en contacto. Esta detección también puede efectuarse mediante la proteína, es decir, detectando la presencia de proteína que ha reaccionado con las moléculas. La detección puede ser, en ambos casos, directa (midiendo las moléculas o proteínas que han reaccionado) o indirecta (midiendo la fracción que no ha reaccionado).

De acuerdo con realizaciones particulares, la al menos una Y_i de origen natural en la proteína que se va a detectar es única para dicha proteína en dicha muestra. Por lo tanto, por ejemplo, en una muestra de origen humano, la secuencia que también aparece en la proteína que se va a detectar está codificada solo una vez en el genoma humano (o se produce solo una vez en el proteoma humano), a saber, en la (secuencia que codifica la) proteína que se va a detectar. Aunque esta unicidad no es siempre necesaria - por ejemplo, cuando proteínas diferentes tienen la misma secuencia y se detectan juntas, siguen pudiéndose discriminar adicionalmente, por ejemplo, basándose en el tamaño - se prevé particularmente que facilita la detección. La parte "en dicha muestra" es importante para determinar la unicidad de la serie de proteína: por ejemplo, en caso de que se procese previamente la muestra, es probable que contenga menos proteínas diferentes que la detección en mezclas complejas o en muestras de diferentes (micro)organismos.

Cabe destacar que los presentes métodos de detección son altamente similares a los métodos establecidos, normalmente métodos de detección a base de anticuerpos. La diferencia significativa es el uso de las moléculas particulares. De hecho, cabe destacar que en los métodos de detección descritos en el presente documento, las moléculas, tal como se han definido en el presente documento, cumplen un papel similar al de los anticuerpos. Por lo tanto, en los métodos de detección que normalmente están basados en anticuerpos, las moléculas descritas en el presente documento pueden reemplazar a al menos un anticuerpo. Por ejemplo, las moléculas donde al menos una Y_i es una serie de origen natural en la proteína que se va a detectar pueden reemplazar a un anticuerpo primario en ensayos de detección (y pueden marcarse como "interferidores primarios"), las moléculas donde Y_i es una serie de origen natural en un anticuerpo primario usado para la detección pueden reemplazar a un anticuerpo secundario. Como alternativa, la molécula interferidora secundaria puede dirigirse a una etiqueta o marcador condensado a un anticuerpo primario o puede dirigirse a un "interferidor primario" o a un resto condensado al mismo.

De acuerdo con realizaciones específicas, la molécula usada para la detección comprende un marcador detectable. De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, la detección en la etapa b) es mediante la detección del marcador detectable.

De acuerdo con realizaciones particulares, los métodos comprenden adicionalmente una separación de moléculas que han reaccionado con la proteína y moléculas que no han reaccionado con la proteína antes de la detección en la etapa b). También puede hacerse lo contrario: separando las proteínas que han reaccionado con las moléculas de las proteínas que no han reaccionado con las moléculas antes de la detección.Cuál de las dos se separa depende normalmente de la configuración del experimento y, por ejemplo, si se inmovilizan proteínas o moléculas.

La detección en la etapa b) puede ser directa o indirecta, por ejemplo, mediante detección de la fracción de moléculas que no ha reaccionado. La detección puede ser cualitativa (por ejemplo, la proteína está presente o no), semicuantitativa (por ejemplo, si hay más o menos cantidad de la proteína presente) o cuantitativa (por ejemplo, qué cantidad hay presente de la proteína).

De acuerdo con realizaciones particulares, la muestra es de un sujeto, particularmente, de un sujeto mamífero, lo más particularmente, de un sujeto humano. Sin embargo, en principio, puede detectarse cualquier proteína que contenga una región de agregación-nucleación, por lo que la fuente de la muestra puede ser de cualquier organismo (por ejemplo, plantas, insectos, patógenos, mamíferos). No es siquiera necesario que la muestra sea de un organismo, en tanto que contenga proteínas. Por ejemplo, puede ser una muestra de fluido (por ejemplo, agua, cerveza) donde se mide la presencia de proteínas (por ejemplo, hormonas, estrógenos) o puede ser una muestra de

alimento o de pienso. Es importante destacar que, para las muestras que proceden de un organismo, no es necesario que la muestra y la proteína que se va a detectar sean de la misma especie. Por ejemplo, en caso de detectar la presencia de un patógeno, se prevé que se tome una muestra de un sujeto o una planta, mientras que la proteína que se va a detectar es de un patógeno (por ejemplo, virus o microorganismo).

5 Dicho de manera general, un método de diagnóstico incluye las siguientes etapas: i) una etapa de examen (la recogida de datos, es decir, la detección cualitativa o cuantitativa de un biomarcador de proteína en una muestra), ii) la comparación de los datos obtenidos con valores estándar (por ejemplo, de muestras procedentes de sujetos no enfermos), iii) el hallazgo de cualquier desviación significativa entre los datos obtenidos y los datos de referencia (es decir, comparando los datos) y iv) atribuir la desviación a una imagen clínica (sujeto animal) o estado (sujeto vegetal). Obsérvese que estas etapas también pueden efectuarse para métodos de detección normales. En este caso, el estado obtenido en la etapa iv) no es para un estado de enfermedad, sino, por ejemplo, para la presencia de contaminantes.

15 Por consiguiente, en realizaciones específicas, la presencia, ausencia o cantidad de proteína detectada es indicativa de un estado de enfermedad (o de salud). Dicho estado de enfermedad puede ser, por ejemplo, la presencia de enfermedad, la ausencia de enfermedad (es decir, el hallazgo de salud), la progresión de la enfermedad (por ejemplo, neoplasia maligna, metástasis, respuesta a la terapia). Algunos ejemplos de proteínas asociadas con estados de enfermedad, por ejemplo, biomarcadores, se encuentran bien documentados en la técnica. Por lo tanto, se proporcionan métodos para la detección de un biomarcador de proteína (es decir, una proteína que indica el estado de enfermedad) en una muestra que comprenden poner en contacto dicha muestra con al menos un interferidor, con especificidad por dicho biomarcador de proteína, opcionalmente aislando el complejo coagregado de interferidor-biomarcador de proteína de dicha muestra y detectar dicho interferidor-biomarcador de proteína. Los biomarcadores de proteínas se usan cada vez más en la clínica para predecir la aparición de enfermedades, diagnosticarlas, controlar su progresión y proporcionar un pronóstico en cuanto a su sensibilidad a agentes terapéuticos (es decir, para predecir la respuesta a agentes terapéuticos, eventos adversos e interacciones farmacológicas y para establecer riesgos iniciales). Algunos ejemplos bien conocidos de biomarcadores para sujetos humanos incluyen el antígeno específico de próstata (PSA) para (la detección temprana de) el cáncer de próstata, el antígeno carcinoembrionario para el cáncer gastrointestinal, la proteína C-reactiva (CRP) para la inflamación sistémica, el factor reumatoide, anticuerpo para el péptido anti-cíclico citrulinado (anti-CCP) para la artritis reumatoide, MMP-3 para el daño articular y anticuerpos para beta amiloide para la enfermedad de Alzheimer. En teoría, los biomarcadores de proteínas son mejores que los marcadores de ARNm debido a su mayor estabilidad y una gama más amplia de tecnologías para estudiarlos. El gran aumento del interés en la investigación sobre biomarcadores está impulsando el desarrollo de nuevos productos predictivos, de diagnóstico y pronósticos en la práctica médica moderna y los biomarcadores también están desempeñando un papel cada vez más importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Los biomarcadores de proteínas pueden identificarse en fluidos corporales (por ejemplo, suero, orina, sangre, saliva, lágrimas, FCR, fluido sinovial, sangre, fluido de aspiración del pezón, ascitis, esperma, sudor, biopsia tumoral). Los biomarcadores pueden dividirse en las categorías de predictivos o pronósticos. Un biomarcador pronóstico se asocia con la probabilidad de un resultado, tal como supervivencia, respuesta (por ejemplo, a una terapia concreta) y recurrencia. Un biomarcador predictivo es un biomarcador que está presente antes de que se produzca un evento y que predice ese resultado. Un biomarcador predictivo puede ser tanto positivo como negativo. Los biomarcadores pueden no solo usarse para diagnosticar una enfermedad, sino también para la selección o el seguimiento de pacientes. A medida que avanza la investigación, la comprensión acerca del papel de los biomarcadores puede desempeñar en la gestión de áreas de enfermedad, tales como el cáncer, la cardiología, la neurología, y enfermedades metabólicas, autoinmunitarias e inflamatorias ha evolucionado.

Una lista no limitante de biomarcadores de proteínas que pueden detectarse con las moléculas interferidoras y los métodos de la presente invención comprende el diagnóstico de biomarcadores de cáncer de pulmón (como en el documento WO2005098445), el diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (como en el documento WO2005034727), el diagnóstico del aneurisma de aorta abdominal (como en el documento WO2009046267), el diagnóstico de enfermedades mediadas por HTLV (como en el documento WO2004029575), el diagnóstico del carcinoma ductal de mama (como en el documento WO2009039023), el diagnóstico del cáncer de próstata (como en el documento WO2004030511), el diagnóstico de la apnea obstructiva del sueño (como en el documento WO2006020567), el pronóstico de pacientes de GBM tratados con Gefitinib (como en el documento WO2010033993), el diagnóstico de la aparición y/o progresión de la esclerosis lateral amiotrófica (como en el documento WO2006060799), el diagnóstico del deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer (como en el documento WO2008014314), el diagnóstico de la fibrosis hepática (como en el documento US20100323374), el diagnóstico de lesiones del sistema nervioso (como en el documento EP2207033), la detección del daño en músculos esqueléticos (como en el documento WO2007066129), el diagnóstico de la apnea obstructiva del sueño (como en el documento WO2006020567), el diagnóstico de carcinomas malignos de mama (como en el documento WO20052463), el diagnóstico de trastornos urológicos (como en el documento WO2010078403), la evaluación *in vitro* de la toxicidad en el desarrollo y la embriotoxicidad (como en el documento WO2009146915), el pronóstico y el resultado del tratamiento del glioblastoma (como en el documento WO2009102729), la evaluación de la lesión y exposición a la radiación (como en el documento WO2008140463), la detección del cáncer de hígado (como en el documento US20050202485), la detección del carcinoma nasofaríngeo (como en el documento US20050158745), la

detección del cáncer de ovario (como en el documento WO2003057014), la predicción de la respuesta clínica a anticuerpos anti-TNF-alfa en pacientes con artritis psoriásica (como en el documento WO2011014349), la detección de biomarcadores salivales para la identificación del cáncer oral y la enfermedad periodontal (como en el documento US20110021370), el diagnóstico del esófago de Barrett y el adenocarcinoma de esófago (como en el documento
 5 WO2010115077), el diagnóstico de la fibrilación auricular y el infarto (como en el documento WO2010113185), la predicción del rechazo de aloinjertos (como en el documento WO2010093869), la predicción de la respuesta clínica a anticuerpos anti-TNF en pacientes con espondilitis anquilosante (como en el documento WO2010077722), el diagnóstico de cistitis intersticial (como en el documento WO2010068747), el diagnóstico y pronóstico de la septicemia (como en el documento US20100292131), el pronóstico para el cáncer colorrectal metacrónico (como en
 10 el documento US20090155842), el control del tratamiento de la ELA con nimesulida (como en el documento WO2004043444).

De acuerdo con realizaciones específicas adicionales donde se detecta un biomarcador de proteína (es decir, al menos una Y_i en las moléculas es una serie de origen natural en una proteína que es indicativa de un estado de enfermedad), estos métodos comprenden además de las etapas a) y b) indicadas anteriormente una etapa c) que correlaciona la presencia, ausencia o cantidad de proteína detectada en la muestra con un estado de enfermedad en un sujeto.

La memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n ;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 25 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína que es indicativa de un
 30 estado de enfermedad; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

para su uso en el diagnóstico de dicho estado de enfermedad.

35 Obsérvese que dichos métodos pueden usarse en plantas, para determinar el estado de enfermedad de la planta.

Una realización específica de los métodos anteriores es el diagnóstico de la presencia de infecciones. De acuerdo con esta realización, la proteína indicativa del estado de enfermedad (es decir, infección) es una proteína de un patógeno (causa de la infección y por lo tanto, indicativa de infección). Por consiguiente, la memoria descriptiva describe moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n ;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 45 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en un patógeno; y
- 50 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

para su uso en el diagnóstico de la infección por dicho patógeno.

55 De nuevo, estos métodos diagnósticos pueden aplicarse a sujetos, así como a plantas (u otros organismos en los que puede haber presencia de una infección).

Sin embargo, el diagnóstico no tiene por qué ser siempre de un estado de enfermedad. Como se ha mencionado, los métodos de detección pueden usarse para determinar niveles de proteínas en muestras no procedentes de un sujeto (como normalmente se encuentran en biotecnología industrial) o pueden usarse para determinar niveles de proteína (por ejemplo, metabolitos) en muestras de organismos sin que esto esté vinculado a enfermedades. Este es el caso particular de la biotecnología de plantas, más particularmente para plantas transgénicas. De hecho, puede ser útil medir niveles de proteínas aumentados o reducidos, por ejemplo, para evaluar qué plantas tienen los mayores niveles de expresión de una proteína útil o qué plantas tienen menos expresión de proteínas nocivas o proteínas que hacen que la planta no sea sabrosa o qué plantas tienen una mejor respuesta a condiciones de estrés.

Ya que en el presente documento se prevén diagnósticos *in vitro*, también se proporcionan kits que comprenden al menos una molécula como se ha descrito en el presente documento y al menos un tampón adecuado. Dicho kit estará idealmente adaptado para el protocolo de detección específico usado. Los kits pueden contener cualquiera de las composiciones farmacéuticas o las composiciones agroquímicas descritas en el presente documento. Además, el kit puede contener uno o más dispositivos, normalmente, dispositivos usados para la detección de la proteína, tales como soportes sólidos (por ejemplo, placas, micromatrices, nanopartículas, ...), opcionalmente precubiertas con las moléculas descritas en el presente documento. El kit puede contener además instrucciones de uso. Obviamente, los kits no se limitan necesariamente a aplicaciones de diagnóstico o detección. Sin embargo, en el caso de los kits proporcionados para el tratamiento de plantas o sujetos animales, los kits contendrán opcionalmente dispositivos con fines de administración (por ejemplo, una jeringuilla, un recipiente con una boquilla pulverizadora) en lugar de dispositivos de laboratorio.

Se conocen de la técnica anterior una serie de modos diferentes para evaluar los niveles de proteínas (o biomarcadores de proteínas), siendo el ELISA un tipo de protocolo representativo y conveniente para ensayar niveles de proteínas. En el ELISA y los ensayos basados en ELISA, pueden inmovilizarse uno o más anticuerpos específicos para las proteínas de interés (o biomarcadores de proteínas) sobre una superficie sólida seleccionada, preferentemente una superficie que muestre una afinidad por las proteínas, tal como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno. Después de lavar para eliminar el material no completamente adsorbido, se recubren los pocillos de la placa de ensayo con una proteína "bloqueante" no específica que se sabe que es antigénicamente neutra respecto de la muestra de ensayo, tal como albúmina sérica bovina (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. Esto permite el bloqueo de sitios de adsorción no específica sobre la superficie de inmovilización, reduciendo de este modo el fondo generado por la unión no específica de antígeno sobre la superficie. Después de lavar para eliminar la proteína de bloqueo no específica, se pone en contacto la superficie de inmovilización con la muestra que se vaya a ensayar en condiciones que propician la formación de complejos inmunitarios (antígeno/anticuerpo). Dichas condiciones incluyen diluir la muestra con diluyentes, tales como BSA o gamma globulina bovina (BGG) en suero salino tamponado con fosfato (PBS)/Tween o PBS/Triton-X 100, que también suelen ayudar a reducir el fondo no específico y dejar incubar la muestra durante aproximadamente 2-4 horas a temperaturas del orden de aproximadamente 25-27°C (aunque pueden usarse otras temperaturas). Después de la incubación, se lava la superficie en contacto con el antisuero para eliminar el material que no ha formado inmunocomplejos. Un procedimiento de lavado ilustrativo incluye lavar con una solución, tal como PBS/Tween, PBS/Triton-X 100 o tampón borato. Después, puede determinarse la aparición y cantidad de formación de inmunocomplejos sometiendo a los inmunocomplejos unidos a un segundo anticuerpo que tiene especificidad por la diana que difiere del primer anticuerpo y detectar la unión del segundo anticuerpo. En ciertas realizaciones, el segundo anticuerpo tendrá una enzima asociada, por ejemplo, ureasa, peroxidasa o fosfatasa alcalina, que generará un precipitado de color tras incubar con un sustrato cromogénico adecuado. Por ejemplo, puede emplearse anti-IgG humana conjugado a ureasa o peroxidasa, durante un periodo de tiempo y en condiciones que favorecen el desarrollo de la formación de inmunocomplejos (por ejemplo, incubación durante 2 h a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS, tal como PBS/Tween). Después de dicha incubación con el segundo anticuerpo y de lavar para eliminar el material no unido, se cuantifica la cantidad de marcador, por ejemplo, mediante incubación con un sustrato cromogénico, tal como urea y púrpura de bromocresol en el caso de un marcador de ureasa o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazol)-6-sulfónico (ABTS) y H₂O₂, en el caso de un marcador de peroxidasa. Después, se logra la cuantificación midiendo el grado de degeneración de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible. Como alternativa, puede alterarse el formato anterior uniendo en primer lugar la muestra a la placa de ensayo. Después, se incuba el anticuerpo primario con la placa de ensayo, seguido de la detección del anticuerpo primario unido usando un segundo anticuerpo marcado con especificidad por el primer anticuerpo. Como alternativa, pueden emplearse métodos no basados en ELISA para medir los niveles de uno o más biomarcadores de proteína en una muestra. Algunos ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, espectrometría de masas, matrices de proteómica, tecnología de microesferas xMAP™, citometría de flujo, transferencia de Western e inmunohistoquímica. De acuerdo con los métodos de la invención y como además se ilustra en la sección de ejemplos, el anticuerpo primario se reemplaza por un interferidor específico que se une al biomarcador de proteína. En una realización específica, dicho interferidor está marcado con una molécula de detección.

En una realización específica, el sustrato sólido sobre el que se inmoviliza el interferidor o los interferidores específicos puede estar hecho de una gran variedad de materiales y con una gran variedad de formas, por ejemplo, placa de microtitulación, micropelotas, varilla graduada, partícula de resina, etc. El sustrato puede seleccionarse para maximizar las relaciones de señal a ruido, para minimizar la unión de fondo, así como para facilitar la separación y el coste. Los lavados pueden efectuarse de una manera lo más adecuada para el sustrato que se esté usando, por ejemplo, eliminando una perla o varilla graduada de un depósito, vaciando o diluyendo un depósito, tal como un pocillo de placa de microtitulación o enjuagando una perla, partícula, columna de cromatografía o filtro con una solución de lavado o con disolvente.

En una realización particular, la detección de un biomarcador de proteína específico es cuantitativa. En otra realización particular, la detección de un biomarcador de proteína específico es cualitativa. Como tal, cuando la detección es cualitativa, los métodos proporcionan una lectura o evaluación, por ejemplo, determinación, de si el biomarcador de proteína está presente o no en la muestra que se esté ensayando. En otras realizaciones más, los métodos proporcionan una detección cuantitativa de si está presente el biomarcador de proteína en la muestra que

se está ensayando, es decir, una evaluación o determinación de la cantidad real o la abundancia relativa del analito diana. En dichas realizaciones, la detección cuantitativa puede ser absoluta o, en caso de que el método sea un método para detectar dos o más biomarcadores de proteína diferentes en una muestra, relativa. Como tal, el término "cuantificar", cuando se usa en el contexto de la cuantificación de un biomarcador de proteína en una muestra, puede referirse a una cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta puede efectuarse mediante la inclusión de concentraciones conocidas de uno o más biomarcadores de proteína de control y referenciando el nivel detectado del biomarcador de proteína a los biomarcadores de proteínas de control conocidos (por ejemplo, mediante la generación de una curva patrón). Como alternativa, puede lograrse una cuantificación relativa mediante comparación de los niveles o cantidades detectados entre dos o más biomarcadores de proteínas diferentes para proporcionar una cuantificación relativa de cada uno de los dos o más biomarcadores de proteína diferentes, por ejemplo, en relación uno con el otro.

En ciertas realizaciones, se evalúa la detección de solo un biomarcador de proteína. En otras realizaciones más, se evalúa la expresión de dos o más, por ejemplo, aproximadamente 3 o más, aproximadamente 10 o más, aproximadamente 15 o más biomarcadores de proteína. Una forma habitual para hacer esto es usando una micromatriz de unión a proteínas (véase más adelante).

En dichas realizaciones, la predicción, el diagnóstico o la caracterización pueden obtenerse proporcionando, es decir, generando, un informe por escrito que incluye la evaluación de control del experto, es decir, la predicción del experto acerca de la aparición de una enfermedad particular, el diagnóstico del experto de la enfermedad del sujeto o la caracterización del experto del pronóstico de la enfermedad del sujeto. Por lo tanto, un método específico puede incluir además una etapa de generar o producir un informe que proporcione los resultados de una evaluación de control, pudiéndose proporcionar dicho informe en forma de un medio electrónico (por ejemplo, una presentación electrónica en un monitor informático) o en forma de un medio tangible (por ejemplo, un informe impreso en papel u otro medio tangible). Un "informe", tal como se describe en el presente documento, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos informativos que proporcionan información de interés relativa a la evaluación de control de un sujeto y sus resultados. Un informe concreto puede generarse completa o parcialmente de manera electrónica. Un informe concreto puede incluir además uno o más de: 1) información acerca de la instalación a cargo de la prueba; 2) información del proveedor del servicio; 3) datos del paciente; 4) datos de la muestra; 5) un informe de evaluación, que puede incluir diversas informaciones que incluyen: a) valores de referencia empleados y b) datos de prueba, donde los datos de prueba pueden incluir, por ejemplo, la determinación de un nivel de proteína; 6) otras características.

El informe puede incluir información acerca de la instalación a cargo de la prueba, siendo dicha información relevante para el hospital, clínica o laboratorio en el que se efectuó la toma de la muestra y/o la generación de los datos. La recogida de la muestra puede incluir obtener una muestra de fluido, por ejemplo, sangre, saliva, orina, etc., una muestra de tejido, por ejemplo, una biopsia de tejido, etc. de un sujeto. La generación de los datos puede incluir medir el nivel de concentración de biomarcador de polipéptido para uno o más biomarcadores que se expresan diferencialmente o están presentes a diferentes niveles en diferentes sujetos.

En muchas realizaciones, los sujetos pertenecen a la clase de los mamíferos, incluyendo el orden de los carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas), lagomorfos (por ejemplo, conejos) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En ciertas realizaciones, los animales u hospedadores, es decir, sujetos (también citados en el presente documento como pacientes) son seres humanos.

Tal como se ha explicado anteriormente en el presente documento, las tecnologías de biodetección más ampliamente usadas están basadas en el uso de anticuerpos. Los anticuerpos reconocen y se unen a otras moléculas basándose en su forma y propiedades fisicoquímicas. Los anticuerpos son ideales para detectar cantidades pequeñas de proteínas diana en presencia de mezclas complejas de proteínas. La presente invención muestra que el uso de moléculas interferidoras es una alternativa al uso de anticuerpos (como elemento de reconocimiento) para la captura específica de proteínas diana. De hecho, las moléculas interferidoras pueden usarse en numerosas aplicaciones en las que normalmente se usan anticuerpos. Por nombrar solo algunas, se prevén aplicaciones en diagnósticos, microanalíticas, ciencias forenses y en la detección específica de patógenos. Para las aplicaciones de detección y separación de la invención, puede ser conveniente que la molécula interferidora esté unida a un vehículo (o un soporte). Un soporte puede ser una superficie plana, tal como un plástico o nitrocelulosa o una columna de cromatografía, pero es preferible una perla, tal como perlas microesféricas. Una descripción general acerca de varios tipos de perlas y microesferas, que cumplen el fin de unirse a moléculas interferidoras, se describe en las páginas 9 y 10 del documento US6682940 y se incorpora al presente documento específicamente por referencia. En una realización particular, la molécula interferidora está unida a un vehículo de tipo carbohidrato, por ejemplo, celulosa o agarosa. Puede unirse un interferidor a dicho vehículo de carbohidrato con un agente reticulante, tal como glutaraldehído. En otra realización particular, el vehículo puede ser celulosa, vidrio o un polímero sintético. La unión covalente entre el interferidor y el vehículo puede llevarse a cabo mediante restos de aminoácidos del interferidor y una azida, carbodiimida, isocianato u otros derivados químicos presentes sobre el interferidor.

En otra realización particular más, el vehículo es una microperla de vidrio silanada porosa. El interferidor puede unirse covalentemente al vehículo mediante sus grupos amina de péptido (mediante la reacción de Schiff, seguida

de reducción con borohidruro de sodio) a grupos aldehído formados por oxidación con peryodato de los grupos glicidoxipropilsilano unidos químicamente a los átomos de silicio (este acoplamiento se describe en Sportsman y Wilson (1980) Anal. Chem. 52, 2013-2018).

5 En una realización específica, el vehículo está recubierto de una película proteica con la que se reticula el interferidor (véanse las reivindicaciones 1-50 y los ejemplos relativos al vehículo en el documento US4478946).

10 En otra realización específica, el soporte es una perla fluorescente, tal como una partícula de látex fluorescente. La patente US4550017 y en especial la página 4 de la misma, describe compuestos fluorescentes que pueden usarse para la fabricación de perlas fluorescentes.

15 En otra realización específica, las perlas son de diversos tamaños y también pueden contener o estar impregnados de colorantes fluorescentes. Debido a los diversos tamaños y colorantes de las perlas, pueden detectarse y cuantificarse múltiples proteínas en una sola reacción. Los procedimientos para el revelado de dichas perlas se describen en el documento US6159748.

20 En otra realización particular más, el acoplamiento entre la perla y el interferidor es mediante una poli(treonina), una poli(serina), dextrano o poli(etilenglicol). Los ejemplos 6, 7, 8 y 9 del documento US6399317 ilustran cómo puede llevarse a cabo este acoplamiento.

En otra realización particular más, el soporte es una perla magnética. Las perlas magnéticas, el acoplamiento entre perlas magnéticas y un agente proteico y sus usos se describen en la página 8 de la solicitud US6489092.

25 De acuerdo con un aspecto adicional, el soporte es una micromatriz. Estas se prevén particularmente para la detección multiplexada de proteínas. Por consiguiente, se proporcionan micromatrices que comprenden moléculas descritas en el presente documento. La memoria descriptiva describe micromatrices que comprenden al menos dos moléculas de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i va de 1 a n;
- 30 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de
- 35 que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

40 De acuerdo con realizaciones particulares, las moléculas se unen a la micromatriz mediante un enlazador (por ejemplo, un resto Z_0 como se describe en el presente documento). La micromatriz puede ser una matriz, chip, perla, placa, transferencia o similar.

45 De acuerdo con otras realizaciones particulares, las al menos dos moléculas son al menos dos moléculas diferentes. En particular, al menos una región Y_i de las moléculas difiere entre las al menos dos moléculas. Más particularmente, al menos una región Y_i de una primera de las moléculas es idéntica a una serie en una proteína que es una proteína diferente a la proteína correspondiente a al menos una región Y_i diferente de una segunda de las moléculas.

50 Aplicación en plantas

Las moléculas descritas en el presente documento también pueden usarse para regular a la baja las funciones de proteínas en plantas, células vegetales o semillas de plantas. Obsérvese en este caso también que, esto se aplica a situaciones no infecciosas e infecciosas, es decir, dirigirse a proteínas de plantas o dirigirse a proteínas de

55 patógenos o a patógenos dentro o sobre la planta. Por consiguiente, la memoria descriptiva describe métodos para regular a la baja la función biológica de una proteína en una planta o célula vegetal o semilla de planta, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- 60 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de
- 65 que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P,

R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína dentro de o sobre dicha planta, célula vegetal o semilla de planta; y

- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

- 5 Las etapas adicionales del método pueden incluir beta-agregación intermolecular que se produce entre la proteína y la molécula de origen no natural, de este modo regulando a la baja la función biológica de la proteína. Ya que los sujetos vegetales, al contrario de los sujetos animales, son inmóviles, son particularmente vulnerables a las infecciones por ectoparásitos y patógenos (es decir, plagas). De hecho, muchas especies infecciosas no entran necesariamente en una planta para ejercer su efecto patógeno o no entran durante las etapas iniciales de la
- 10 infección (por ejemplo, también debido a que las plantas no tienen un sistema digestivo y una pared celular, lo que dificulta que los patógenos accedan al interior de la planta). Por lo tanto, una "proteína en una planta, célula vegetal o semilla de planta" se refiere generalmente a una proteína de otro organismo que está presente en la planta, célula vegetal o semilla de planta. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, proteínas de nematodos, áfidos, ácaros, orugas, babosas, mohos y similares. Obsérvese que estos organismos pueden estar presentes en cualquier parte de la planta (por ejemplo, los nematodos normalmente infectan a través de las raíces de la planta, mientras que los áfidos estarán presentes generalmente en las partes verdes de la planta, tales como el tallo y las hojas).

- Por lo tanto, los métodos pueden subdividirse en métodos para regular a la baja la función biológica de una proteína vegetal en una planta (por ejemplo, para obtener una propiedad particular, tal como rendimiento aumentado o
- 20 tolerancia al estrés o en situaciones de enfermedad no infecciosa) y en métodos para regular a la baja la función biológica de una proteína de un organismo de plaga en o sobre una planta (como es el caso en una enfermedad infecciosa).

- La memoria descriptiva describe dichos métodos anteriores (para regular a la baja la función biológica de una proteína vegetal en una planta o célula vegetal o semilla de planta), que incluyen la etapa de poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de dicha planta, célula vegetal o semilla de planta; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

- 40 La memoria descriptiva describe dichos últimos métodos (para regular a la baja la función biológica de una proteína de un organismo de plaga vegetal en una planta o célula vegetal o semilla de planta), que comprenden poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
- cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína de un organismo de plaga presente dentro de o sobre dicha planta, célula vegetal o semilla de planta; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

- 55 El término "planta", tal como se usa en el presente documento, abarca plantas completas, ancestros y descendencia de las plantas y partes de plantas, incluyendo semillas, brotes, tallos, hojas, raíces (incluyendo tubérculos), flores y tejidos y órganos, en donde cada uno de los anteriores comprende el gen/ácido nucleico de interés. El término "planta" también abarca células vegetales, cultivos en suspensión, tejido de callo, embriones, regiones meristémicas, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas, nuevamente en donde cada uno de los anteriores comprende el gen/ácido nucleico de interés.

- Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen, en particular, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo forraje o legumbres forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos seleccionados de la lista que comprende *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp.

- (por ejemplo, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (por ejemplo, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [colza, colza oleaginosa, nabo]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (por ejemplo, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (por ejemplo, *Glycine max*, *Soja hispida* o *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (por ejemplo, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (por ejemplo, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (por ejemplo, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (por ejemplo, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (por ejemplo, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaii*, *Triticum* spp. (por ejemplo, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* o *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre otros.
- Las plagas de plantas, tal como se usan en el presente documento, son en particular insectos, arácnidos, helmintos, hongos, virus, bacterias, nematodos y moluscos encontrados en agricultura, en horticultura, en bosques, en jardines y en instalaciones de recreo. Las composiciones de acuerdo con la invención son activas contra especies normalmente sensibles y resistentes y contra todas o algunas etapas del desarrollo. Estas plagas de plantas incluyen: plagas del filo: *Arthropoda*, en particular de la clase de los arácnidos, por ejemplo, *Acarus* spp., *Aceria sheldoni*, *Aculops* spp., *Aculus* spp., *Amblyomma* spp., *Amphitetranychus viennensis*, *Argas* spp., *Boophilus* spp., *Brevipalpus* spp., *Bryobia praetiosa*, *Centruroides* spp., *Choriopetes* spp., *Dermanyssus gallinae*, *Dermatophagoides pteronyssus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermacentor* spp., *Eotetranychus* spp., *Epitrimerus pyri*, *Eutetranychus* spp., *Eriophyes* spp., *Halotydeus destructor*, *Hemitarsonemus* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp., *Latrodectus* spp., *Loxosceles* spp., *Metatetranychus* spp., *Nuphessa* spp., *Oligonychus* spp., *Ornithodoros* spp., *Ornithonyssus* spp., *Panonychus* spp., *Phyllocoptura oleivora*, *Polyphagotarsonemus latus*, *Psoroptes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Rhizoglyphus* spp., *Sarcoptes* spp., *Scorpio maurus*, *Stenotarsonemus* spp., *Tarsonemus* spp., *Tetranychus* spp., *Vaejovis* spp., *Vasates lycopersici*.
- Otros ejemplos son del orden de los *Anoplura* (*Phthiraptera*), por ejemplo, *Damalinia* spp., *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Ptirus pubis*, *Trichodectes* spp.
- Otros ejemplos más son del orden de los *Chilopoda*, por ejemplo, *Geophilus* spp., *Scutigera* spp. Otros ejemplos más son del orden de los coleópteros, por ejemplo, *Acalymma vittatum*, *Acanthoscelides obtectus*, *Adoretus* spp., *Agelastica alni*, *Agriotes* spp., *Alphitobius diaperinus*, *Amphimallon solstitialis*, *Anobium punctatum*, *Anoplophora* spp., *Anthonomus* spp., *Anthrenus* spp., *Apion* spp., *Apogonia* spp., *Atomaria* spp., *Attagenus* spp., *Bruchidius obtectus*, *Bruchus* spp., *Cassida* spp., *Ceratomyza trifurcata*, *Ceutorhynchus* spp., *Chaetocnema* spp., *Cleonus mendicus*, *Conoderus* spp., *Cosmopolites* spp., *Costelytra zealandica*, *Ctenicera* spp., *Curculio* spp., *Cryptorhynchus lapathi*, *Cylindrocopturus* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Dichocrocis* spp., *Diloboderus* spp., *Epilachna* spp., *Epitrix* spp., *Faustinus* spp., *Gibbium psylloides*, *Hellula undalis*, *Heteronychus arator*, *Heteronyx* spp., *Hylamorpha elegans*, *Hylotrupes bajulus*, *Hypera postica*, *Hypothenemus* spp., *Lachnosterna consanguinea*, *Lema* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Leucoptera* spp., *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Lixus* spp., *Luperodes* spp., *Lyctus* spp., *Megascelis* spp., *Melanotus* spp., *Meligethes aeneus*, *Melolontha* spp., *Migdolus* spp., *Monochamus* spp., *Naupactus xanthographus*, *Niptus hololeucus*, *Oryctes rhinoceros*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Oryzaphagus oryzae*, *Otiorrhynchus* spp., *Oxycetonia jucunda*, *Phaedon cochleariae*, *Phyllophaga* spp., *Phyllotreta* spp., *Popillia japonica*, *Premnotrypes* spp., *Prostephanus truncatus*, *Psylliodes* spp., *Ptinus* spp., *Rhizobius ventralis*, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus* spp., *Sphenophorus* spp., *Stegobium paniceum*, *Sternechus* spp., *Symphyletes* spp., *Tanymericus* spp., *Tenebrio molitor*, *Tribolium* spp., *Trogoderma* spp., *Tychius* spp., *Xylotrechus* spp., *Zabrus* spp.
- Otros ejemplos más son del orden de los colémbolos, por ejemplo, *Onychiurus armatus*.
- Otros ejemplos más son del orden de los *Diplopoda*, por ejemplo, *Blaniulus guttulatus*.
- Otros ejemplos más son del orden de los dípteros, por ejemplo, *Aedes* spp., *Agromyza* spp., *Anastrepha* spp., *Anopheles* spp., *Asphondylia* spp., *Bactrocera* spp., *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis capitata*, *Chironomus* spp., *Chrysomyia* spp., *Chrysops* spp., *Cochliomyia* spp., *Contarinia* spp., *Cordylobia anthropophaga*, *Culex* spp., *Culicoides* spp., *Culiseta* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus oleae*, *Dasyneura* spp., *Delia* spp., *Dermatobia*

- hominis*, *Drosophila* spp., *Echinocnemus* spp., *Fannia* spp., *Gasterophilus* spp., *Glossina* spp., *Haematopota* spp., *Hydrellia* spp., *Hylemyia* spp., *Hyppobosca* spp., *Hypoderma* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Lutzomia* spp., *Mansonia* spp., *Musca* spp., *Nezara* spp., *Oestrus* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia* spp., *Phlebotomus* spp., *Phorbia* spp., *Phormia* spp., *Prodiplosis* spp., *Psila rosae*, *Rhagoletis* spp., *Sarcophaga* spp., *Simulium* spp., *Stomoxys* spp.,
- 5 *Tabanus* spp., *Tannia* spp., *Tetanops* spp., *Tipula* spp.
Otros ejemplos más son del orden de los *Heteroptera*, por ejemplo, *Anasa tristis*, *Antestiopsis* spp., *Boisea* spp., *Blissus* spp., *Calocoris* spp., *Campylomma livida*, *Cavelerius* spp., *Cimex* spp., *Collaria* spp., *Creontiades dilutus*, *Dasyneus piperis*, *Dichelops furcatus*, *Diconocoris hewetti*, *Dysdercus* spp., *Euschistus* spp., *Eurygaster* spp., *Heliopeltis* spp., *Horcias nobilellus*, *Leptocoris* spp., *Leptoglossus phyllopus*, *Lygus* spp., *Macropes excavatus*,
- 10 *Miridae*, *Monalonion atratum*, *Nezara* spp., *Oebalus* spp., *Pentomidae*, *Piesma quadrata*, *Piezodorus* spp., *Psallus* spp., *Pseudacysta perseae*, *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scaptocoris castanea*, *Scotinophora* spp., *Stephanitis nashi*, *Tibraca* spp., *Triatoma* spp.
Otros ejemplos más son del orden de los *Homoptera*, por ejemplo, *Acyrtosipon* spp., *Acrogonia* spp., *Aeneolamia* spp., *Agonosceca* spp., *Aleurodes* spp., *Aleulobus barodensis*, *Aleurothrix* spp., *Amrasca* spp., *Anuraphis cardui*,
- 15 *Aonidiella* spp., *Aphanostigma pin*, *Aphis* spp., *Arboridia apicalis*, *Aspidiella* spp., *Aspidiotus* spp., *Atanus* spp., *Aulacorthum solani*, *Bemisia* spp., *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycolus* spp., *Brevicoryne brassicae*, *Calligypona marginata*, *Carneiocephala fulgida*, *Ceratovacuna lanigera*, *Cercopidae*, *Ceroplastes* spp., *Chaetosiphon fragaefolii*, *Chionaspis tegalensis*, *Chlorita onukii*, *Chromaphis juglandicola*, *Chrysomphalus ficus*, *Cicadulina mbila*, *Coccoomytilus halli*, *Coccus* spp., *Cryptomyzus ribis*, *Dalbulus* spp., *Dialeurodes* spp., *Diaphorina* spp., *Diaspis* spp.,
- 20 *Drosicha* spp., *Dysaphis* spp., *Dysmicoccus* spp., *Empoasca* spp., *Eriosoma* spp., *Erythroneura* spp., *Euscelis bilobatus*, *Ferrisia* spp., *Geococcus coffeae*, *Hieroglyphus* spp., *Homalodisca coagulata*, *Hyalopterus arundinis*, *Icerya* spp., *Idiocerus* spp., *Idioscopus* spp., *Laodelphax striatellus*, *Lecanium* spp., *Lepidosaphes* spp., *Lipaphis erysimi*, *Macrosiphum* spp., *Mahanarva* spp., *Melanaphis sacchari*, *Metcalfiella* spp., *Metopolophium dirhodum*, *Monellia costalis*, *Monelliopsis pecanis*, *Myzus* spp., *Nasonovia ribisnigri*, *Nephotettix* spp., *Nilaparvata lugens*,
- 25 *Oncometopia* spp., *Orthezia praelonga*, *Parabemisia myricae*, *Paratrioza* spp., *Parlatoria* spp., *Pemphigus* spp., *Peregrinus maidis*, *Phenacoccus* spp., *Phloeomyzus passerinii*, *Phorodon humuli*, *Phylloxera* spp., *Pinnaspis aspidistrae*, *Planococcus* spp., *Protopulvinaria pyriformis*, *Pseudaulacaspis pentagona*, *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pteromalus* spp., *Pyrilla* spp., *Quadraspidiotus* spp., *Quesada gigas*, *Rastrococcus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp., *Scaphoides titanus*, *Schizaphis graminum*, *Selenaspis articulatus*, *Sogata* spp., *Sogatella furcifera*,
- 30 *Sogatodes* spp., *Stictocephala festina*, *Tenalaphara malayensis*, *Tinocallis caryaefoliae*, *Tomaspis* spp., *Toxoptera* spp., *Triaeurodes* spp., *Triozia* spp., *Typhlocyba* spp., *Unaspis* spp., *Viteus vitifolii*, *Zygina* spp.
Otros ejemplos más son del orden de los himenópteros, por ejemplo, *Acromyrmex* spp., *Athalia* spp., *Atta* spp., *Diprion* spp., *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Solenopsis invicta*, *Tapinoma* spp., *Vespa* spp.
Otros ejemplos más son del orden de los *Isopoda*, por ejemplo, *Armadillidium vulgare*, *Oniscus asellus*, *Porcellio scaber*.
- 35 Otros ejemplos más son del orden de los *Isoptera*, por ejemplo, *Coptotermes* spp., *Cornitermes cumulans*, *Cryptotermes* spp., *Incisitermes* spp., *Microtermes obesi*, *Odontotermes* spp., *Reticulitermes* spp.
Otros ejemplos más son del orden de los lepidópteros, por ejemplo, *Acronicta major*, *Adoxophyes* spp., *Aedia leucomelas*, *Agrotis* spp., *Alabama* spp., *Amyelois transitella*, *Anarsia* spp., *Anticarsia* spp., *Argyroproce* spp.,
- 40 *Barathra brassicae*, *Borbo cinnara*, *Bucculatrix thurberiella*, *Bupalus piniarius*, *Busseola* spp., *Cacoecia* spp., *Caloptilia theivora*, *Capua reticulana*, *Carpocapsa pomonella*, *Carposina niponensis*, *Chematobia brumata*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocerus* spp., *Cnephasia* spp., *Conopomorpha* spp., *Conotrachelus* spp., *Copitarsia* spp., *Cydia* spp., *Dalaca noctuides*, *Diaphania* spp., *Diatraea saccharalis*, *Earias* spp., *Ecdytophaga aurantium*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Eldana saccharina*, *Ephesia* spp., *Epilotia* spp., *Epiphyas postvittana*, *Etiella* spp., *Eulia* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp., *Galleria mellonella*, *Gracillaria* spp., *Grapholitha* spp., *Hedylepta* spp., *Helicoverpa* spp., *Heliopsis* spp., *Hofmannophila pseudopretella*, *Homoeosoma* spp., *Homona* spp., *Hyponomeuta padella*, *Kakivoria flavofasciata*, *Laphygma* spp., *Laspeyresia molesta*, *Leucinodes orbonalis*, *Leucoptera* spp., *Lithocolletis* spp., *Lithophane antennata*, *Lobesia* spp., *Loxagrotis albicosta*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma neustria*, *Maruca testulalis*, *Mamestra brassicae*,
- 50 *Mocis* spp., *Mythimna separata*, *Nymphula* spp., *Oiketicus* spp., *Oria* spp., *Orthaga* spp., *Ostrinia* spp., *Oulema oryzae*, *Panolis flammea*, *Parnara* spp., *Pectinophora* spp., *Perileucoptera* spp., *Phthorimaea* spp., *Phyllocnistis citrella*, *Phyllonorycter* spp., *Pieris* spp., *Platynota stultana*, *Plodia interpunctella*, *Plusia* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Prodenia* spp., *Protoparce* spp., *Pseudaletia* spp., *Pseudoplusia includens*, *Pyrausta nubilalis*, *Rachiplusia nu*, *Schoenobius* spp., *Scirpophaga* spp., *Scotia segetum*, *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Stathmopoda* spp., *Stomopteryx subsecivella*, *Synanthedon* spp., *Tecia solanivora*, *Thermesia gemmatilis*, *Tinea pellionella*, *Tineola bisselliella*, *Tortrix* spp., *Trichophaga tapetzella*, *Trichoplusia* spp., *Tuta absoluta*, *Virachola* spp.
- 55 Otros ejemplos más son del orden de los *Orthoptera*, por ejemplo, *Acheta domesticus*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Dichroplus* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Melanoplus* spp., *Periplaneta* spp., *Pulex irritans*, *Schistocerca gregaria*, *Supella longipalpa*.
Otros ejemplos más son del orden de los *Siphonaptera*, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp., *Ctenocephalides* spp., *Tunga penetrans*, *Xenopsylla cheopis*.
Otros ejemplos más son del orden de los *Symphyla*, por ejemplo, *Scutigera* spp.
Otros ejemplos más son del orden de los *Thysanoptera*, por ejemplo, *Anaphothrips obscurus*, *Baliothrips biformis*,
- 65 *Drepanothrips reuteri*, *Enneothrips flavens*, *Frankliniella* spp., *Heliethrips* spp., *Hercinothrips femoralis*, *Rhipiphorotheis cruentatus*, *Scirtothrips* spp., *Taeniothrips cardamoni*, *Thrips* spp.

Otros ejemplos más son del orden de los *Zygentoma* (= *Thysanura*), por ejemplo, *Lepisma saccharina*, *Thermobia domestica*.

En otra realización, las plagas del filo *Mollusca*, en particular de la clase de los *Bivalvia*, por ejemplo, *Dreissena* spp. también son plagas de plantas importantes.

5 En otra realización, las plagas de la clase de los *Gastropoda* son plagas de plantas importantes, por ejemplo, *Anion* spp., *Biomphalaria* spp., *Bulinus* spp., *Deroceas* spp., *Galba* spp., *Lymnaea* spp., *Oncomelania* spp., *Pomacea* spp., *Succinea* spp.

10 En otra realización más, las plagas de plantas son del filo *Nematoda* y son plagas de plantas importantes, es decir, nematodos fitoparasíticos, lo que significa nematodos parásitos de plantas que causan daño a las plantas. Los nematodos de plantas abarcan nematodos parásitos de plantas y nematodos que viven en el suelo. Los nematodos parásitos de plantas incluyen, pero sin limitación, ectoparásitos, tales como *Xiphinema* spp., *Longidorus* spp. y *Trichodorus* spp.; semiparásitos, tales como *Tylenchulus* spp.; endoparásitos migratorios, tales como *Pratylenchus* spp., *Radopholus* spp. y *Scutellonema* spp.; parásitos sedentarios, tales como *Heterodera* spp., *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. y endoparásitos del tallo y las hojas, tales como *Ditylenchus* spp., *Aphelenchoides* spp. y *Hirshmaniella* spp. Además, los nematodos del suelo parásitos de las raíces dañinos son nematodos formadores de quistes de los géneros *Heterodera* o *Globodera* y/o nematodos del nudo de la raíz del género *Meloidogyne*. Las especies dañinas de estos géneros son, por ejemplo, *Meloidogyne incognata*, *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja), *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* (nematodo del quiste de la patata). Otros géneros importantes más relevantes como plagas de plantas comprenden *Rotylenchulus* spp., *Paratrichodorus* spp., *Pratylenchus penetrans*, *Radolophus similis*, *Ditylenchus dispaci*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema* spp., *Bursaphelenchus* spp. y similares. En particular *Aphelenchoides* spp., *Bursaphelenchus* spp., *Ditylenchus* spp., *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Longidorus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Trichodorus* spp., *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema* spp.

25 En otra realización más, las plagas de plantas son virus y los métodos de la invención se dirigen al tratamiento de una infección vírica o a la inhibición de la infectividad vírica en una planta, seleccionándose el virus de plantas entre un alfamovirus, un allexivirus, un alfacriptovirus, un anulavirus, un apscaviroide, un aureusvirus, un avenavirus, un aisuiviroide, un badnavirus, un begomovirus, un benivirus, un betacriptovirus, un betaflexiviridae, un bromovirus, un bimovirus, un capilovirus, un carlavirus, un carmovirus, un caulimovirus, un cavemovirus, un cheravirus, un closterovirus, un cocadviroide, un coleviroide, un comovirus, un crinivirus, un cucumovirus, un curtovirus, un citorabdovirus, un diantovirus, un enamovirus, un umbravirus y virus satélite de tipo B, un fabavirus, un fijivirus, un furovirus, un hordeivirus, un hostuiviroide, un idaeovirus, un ilarvirus, un ipomovirus, un luteovirus, un maclomovirus, un macluravirus, un marafivirus, un mastrevirus, un nanovirus, un necrovirus, un nepovirus, un nucleorabdovirus, un oleavirus, un ofiovirus, un orizavirus, un panicovirus, un pecluvirus, un petuvirus, un fitoreovirus, un polerovirus, un pomovirus, un pospiviroides, un potexvirus, un potivirus, un reovirus, un rabdovirus, un rimovirus, un sadwavirus, un virus smilar a SbCMV, un sequivirus, un sobemovirus, un tenuivirus, un virus satélite similar a TNsatV, un tobamovirus, un topocovirus, un tospovirus, un tricovirus, un tritimovirus, un tungrovirus, un timovirus, un umbravirus, un varicosavirus, un vitivirus o un waikavirus.

40 En otra realización más, las plagas de plantas pueden ser hongos patógenos de plantas. Dichos hongos de plantas incluyen, pero sin limitación, aquellos seleccionados del grupo que consiste en los géneros: *Alternaria*; *Ascochyta*; *Botrytis*; *Cercospora*; *Colletotrichum*; *Diplodia*; *Erysiphe*; *Fusarium*; *Leptosphaeria*; *Gaeumanomyces*; *Helminthosporium*; *Macrophomina*; *Nectria*; *Peronospora*; *Phoma*; *Phymatotrichum*; *Phytophthora*; *Plasmopara*; *Podosphaera*; *Puccinia*; *Puthium*; *Pyrenophora*; *Pyricularia*; *Pythium*; *Rhizoctonia*; *Scerotium*; *Sclerotinia*; *Septoria*; *Thielaviopsis*; *Uncinula*; *Venturia*; y *Verticillium*. Algunos ejemplos específicos de infecciones por hongos en plantas que pueden tratarse con los interferidores de la presente invención incluyen, *Erysiphe graminis* en cereales, *Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea* en curcubitáceas, *Podosphaera leucotricha* en manzanas, *Uncinula necator* en vides, *Puccinia* sp. en cereales, *Rhizoctonia* sp. en algodón, patatas, arroz y campos, *Ustilago* sp. en cereales y caña de azúcar, *Venturia inaequalis* (costra) en manzanas, *Helminthosporium* sp. en cereales, *Septoria nodorum* en el trigo, *Septoria tritici* en el trigo, *Rhynchosporium secalis* en la cebada, *Botrytis cinerea* (moho gris) en las fresas, tomates y uvas, *Cercospora arachidicola* en cacahuetes, *Peronospora tabacina* en el tabaco u otros *Peronospora* en diversos cultivos, *Pseudocercospora herpotrichoides* en el trigo y la cebada, *Pyrenophora teres* en la cebada, *Pyricularia oryzae* en el arroz, *Phytophthora infestans* en patatas y tomates, *Fusarium* sp. (tales como *Fusarium oxysporum*) y *Verticillium* sp. en diversas plantas, *Plasmopara viticola* en las uvas, *Alternaria* sp. en frutas y hortalizas, *Pseudoperonospora cubensis* en el pepino, *Mycosphaerella fijiensis* en el plátano, *Ascochyta* sp. en guisantes, *Leptosphaeria* sp. en la colza y *Colleotrichum* sp. en diversos cultivos.

60 En otra realización particular, las plagas de plantas son bacterias patógenas de plantas incluyendo, pero sin limitación, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (que causa la raya parda bacteriana del arroz), *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (que causa la mancha marrón bacteriana de la cattleya), *Acidovorax konjaci Konnyaku* (que causa la plaga bacteriana de la hoja), *Agrobacterium rhizogenes* (que causa la raíz peluda del melón), *Agrobacterium tumefaciens* (que causa la agalla de la corona), *Burkholderia andropogonis* (que causa la mancha bacteriana del clavel), *Burkholderia caryophylli* (que causa la marchitez bacteriana del clavel), *Burkholderia cepacia* (que causa la macha marrón bacteriana del cymbidium), *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (que causa la putrefacción del cuello del gladiolo), *Burkholderia glumae* (que causa la podredumbre del grano bacteriana del arroz), *Burkholderia plantarii* (que causa la marchitez bacteriana de la plántula del arroz), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (que causa el cancro bacteriano del tomate), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (que causa la podredumbre

anillada de la patata), *Clostridium* spp. (que causa la podredumbre fangosa de la patata), *Curtobacterium flaccumfaciens* (que causa el cancro bacteriano de la cebolla), *Erwinia amylovora* (que causa la niebla del peral), *Erwinia ananas* (que causa pardeamiento bacteriano de la palea del arroz), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (que causa el tallo negro de la patata), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (que causa la podredumbre blanda de las hortalizas), *Erwinia chrysanthemi* (que causa la plaga bacteriana de las plántulas de taro), *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* (que causa la podredumbre bacteriana del tallo del arroz), *Erwinia herbicola* pv. *milletiae* (que causa las agallas bacteriana de glicinas), *Pseudomonas cichorii* (que causa la mancha bacteriana del crisantemo), *Pseudomonas corrugate Pith* (que causa la necrosis del tomate), *Pseudomonas fuscovaginae* (que causa la podredumbre parda de la vaina del arroz), *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (que causa la podredumbre blanda de la col), *Pseudomonas rubrisubalbicans* (que causa rayas moteadas de la caña de azúcar), *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (que causa la plaga bacteriana de la remolacha azucarera), *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea* (que causa el añublo de halo del raigrás), *Pseudomonas syringae* pv. *castaneae* (que causa el cancro bacteriano de la castaña), *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (que causa el tizón bacteriano de soja), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (que causa la mancha bacteriana del pepino), *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (que causa la mancha negra bacteriana de la col), *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (que causa el tizón bacteriano de la morera), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (que causa el cancro bacteriano de la ciruela), *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* (que causa el añublo de halo del arroz), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (que causa el añublo de halo de la alubia), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (que causa la plaga bacteriana del guisante), *Pseudomonas syringae* pv. *sesame* (que causa la mancha bacteriana del sésamo), *Pseudomonas syringae* pv. *stratifaciens* (que causa la marchitez a rayas de la avena), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (que causa la mancha marrón bacteriana de la perla roja pequeña), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (que causa el fuego salvaje del tabaco), *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (que causa la plaga bacteriana del té), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (que causa la mancha foliar bacteriana del tomate), *Pseudomonas viridiflava* (que causa la mancha marrón bacteriana de la alubia), *Ralstonia solanacearum* (que causa marchitamiento bacteriano), *Rathayibacter rathayi* (que causa la plaga bacteriana de la hierba orchard), *Streptomyces scabies* (que causa la costra común de la patata), *Streptomyces ipomoea* (que causa la podredumbre del suelo de la batata), *Xanthomonas albilineans* (que causa la raya blanca de la caña de azúcar), *Xanthomonas campestris* pv. *cerealis* (que causa la raya bacteriana del centeno), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (que causa la podredumbre negra), *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (que causa el cancro de los cítricos), *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (que causa la mancha marrón bacteriana del pepino), *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (que causa la pústula bacteriana de la soja), *Xanthomonas campestris* pv. *incanae* (que causa la podredumbre negra del mango), *Xanthomonas campestris* pv. (que causa la mancha foliar angular del algodón malvacearum), *Xanthomonas campestris* pv. (que causa el cancro bacteriano del mango), *Mangiferaeindicae Xanthomonas campestris* pv. *mellea* (que causa la mancha foliar bacteriana del tabaco de Wisconsin), *Xanthomonas campestris* pv. (que causa la mancha bacteriana de grandes nigromaculans bardana), *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (que causa la pústula bacteriana de la alubia), *Xanthomonas campestris* pv. *pisi* (que causa la podredumbre del tallo de la alubia), *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (que causa el agujero de bala bacteriano del melocotón), *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (que causa la mancha bacteriana del nabo japonés), *Xanthomonas campestris* pv. *ricini* (que causa la mancha bacteriana de la planta de la colza), *Xanthomonas campestris* pv. *theicola* (que causa el cancro del té), *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (que causa la plaga bacteriana de la hierba orchard), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (que causa la mancha bacteriana del tomate), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (que causa el marchitamiento foliar bacteriano del arroz). Aunque la molécula puede administrarse tal cual, en plantas, se prevé particularmente usar una estrategia transgénica. En estos casos, los métodos hacen uso de secuencias de ácido nucleico de origen no natural que codifican una molécula que tiene la siguiente estructura:

- 45 $(X_{2i-1}Y_iX_{2i}Z_i)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición; y en donde
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P; lo más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, D y P;
 - 50 - cada Y_i se selecciona independientemente de entre una serie de 4 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que esté presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie de origen natural en una proteína en una planta, célula vegetal o semilla de planta (o en una proteína de un patógeno de plantas); y
 - 55 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada.

60 Por lo tanto, los métodos anteriores pueden reformularse como métodos para regular a la baja la función biológica de una proteína vegetal en una planta o célula vegetal o semilla de planta (o para regular a la baja la función biológica de una proteína de un organismo de plaga en una planta o célula vegetal o semilla de planta, respectivamente), que comprenden transformar dicha planta, célula vegetal o semilla de planta, con una (es decir, al menos una) secuencia de ácido nucleico de origen no natural que codifica una molécula que tiene la estructura indicada anteriormente.

65 Como alternativa, los métodos pueden reformularse como métodos para regular a la baja la función biológica de una proteína vegetal en una planta o célula vegetal o semilla de planta (o para regular a la baja la función biológica de

una proteína de un organismo de plaga en una planta o célula vegetal o semilla de planta, respectivamente), que comprenden expresar, en dicha planta, célula vegetal o semilla de planta, secuencias de ácido nucleico de origen no natural que codifican una molécula que tiene la estructura indicada anteriormente.

- 5 De acuerdo con realizaciones específicas, la secuencia de polipéptido codificada es un polipéptido de origen no natural. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la secuencia de ácido nucleico es un gen artificial. Un gen artificial comprende normalmente los siguientes elementos de ADN unidos operativamente: a) un promotor expresable en plantas, b) una secuencia de ácido nucleico (en particular, ADN) que codifica la molécula descrita anteriormente y c) una región 3' terminal que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en las células de dicha planta.

15 Ya que el aspecto del ácido nucleico es particularmente adecuado en aplicaciones que emplean expresión transgénica, las realizaciones particularmente previstas son aquellas donde la secuencia de ácido nucleico (o el gen artificial) se fusiona a otro resto, en particular, un resto que aumenta la solubilidad y/o la estabilidad del producto génico. De hecho, en ocasiones, la expresión transgénica de péptidos puede ser difícil, debido a la rápida degradación del producto. Por lo tanto, un gen artificial comprende los siguientes elementos de ADN unidos operativamente: a) un promotor expresable en plantas, b) un ácido nucleico que codifica una molécula interferidora fusionado a un resto que potencia la solubilidad (impide la agregación) de la molécula interferidora y c) una región 3' terminal que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

25 La memoria descriptiva describe vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula como se ha descrito en el presente documento. Estos vectores recombinantes son idealmente adecuados como vehículos para portar la secuencia de ácido nucleico de interés al interior de una célula donde se expresa la proteína que se vaya a regular a la baja y dirigir la expresión del ácido nucleico en dicha célula. El vector recombinante puede permanecer en forma de una entidad separada en la célula (por ejemplo, en forma de un plásmido) o puede integrarse en el genoma de la célula.

30 Más particularmente, la molécula es un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos presente en un vector recombinante y que, tras su introducción en la célula vegetal, la semilla de planta o la planta, produce dicho polipéptido en dicha célula vegetal, la semilla de planta o la planta. En estos casos, la puesta en contacto entre la proteína y la molécula de origen no natural se produce mediante la expresión de dicha molécula de origen no natural en dicha planta o célula vegetal. La función biológica de la proteína, por lo tanto, se regula a la baja mediante la expresión de la molécula interferidora.

35 Por consiguiente, la memoria descriptiva describe plantas o células vegetales o semillas de plantas, que contienen una secuencia de ácido nucleico, un gen artificial o un vector recombinante como se ha descrito en el presente documento. También se prevén en el presente documento protoplastos de plantas que contienen dichas secuencias.

40 En la presente invención, un "promotor expresable en plantas" comprende elementos reguladores, que median la expresión de un segmento de secuencia codificante en células vegetales. Para la expresión en plantas, la molécula de ácido nucleico ha de estar unida operativamente a o comprender un promotor adecuado que expresa el gen en el instante correcto y con el patrón de expresión espacial necesario. Para la identificación de promotores funcionalmente equivalentes, puede analizarse la fuerza del promotor y/o el patrón de expresión de un promotor candidato, por ejemplo, uniendo operativamente el promotor a un gen indicador y evaluando el nivel y el patrón de expresión del gen indicador en diversos tejidos de la planta. Los genes indicadores adecuados bien conocidos incluyen, por ejemplo, beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa. La actividad del promotor se evalúa midiendo la actividad enzimática de la beta-glucuronidasa o la beta-galactosidasa. La fuerza del promotor y/o el patrón de expresión pueden compararse entonces con los de un promotor de referencia (tal como el usado en los métodos de la presente invención). Como alternativa, la fuerza del promotor puede evaluarse cuantificando los niveles de ARNm o comparando los niveles de ARNm del ácido nucleico usado en los métodos de la presente invención, con los niveles de ARNm de genes constitutivos, tales como ARNr 18S, usando métodos conocidos en la técnica, tales como transferencia de Northern con análisis densitométrico de los autorradiogramas, PCR cuantitativa en tiempo real o RT-PCR (Heid et al., 1996 Genome Methods 6: 986-994). Por "promotor débil" se entiende normalmente un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante a bajo nivel. Por "bajo nivel" se entiende niveles de aproximadamente 1/10.000 transcritos a aproximadamente 1/100.000 transcritos, hasta aproximadamente 1/500.000 transcritos por célula. Por el contrario, un "promotor fuerte" dirige la expresión de una secuencia codificante a alto nivel o a de aproximadamente 1/10 transcritos a aproximadamente 1/100 transcritos hasta aproximadamente 1/1000 transcritos por célula. En general, por "promotor de fuerza intermedia" se entiende un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante a un nivel menor que un promotor fuerte, en particular a un nivel que es, en todos los casos, menores que el obtenido cuando está bajo el control del promotor 35S de CaMV.

55 La expresión "unido operativamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de tal forma que la secuencia del promotor es capaz de iniciar la transcripción del gen de interés.

65 Un "promotor constitutivo" se refiere a un promotor que es transcripcionalmente activo durante la mayor parte, pero no necesariamente todas, las fases del crecimiento y desarrollo y en la mayor parte de las condiciones ambientales,

en al menos una célula, tejido u órgano. Un promotor "ubícuo" está activo en sustancialmente todos los tejidos o células de un organismo. Un promotor regulado por el desarrollo está activo durante ciertas etapas del desarrollo o en partes de la planta que sufren cambios de desarrollo. Un promotor inducible tiene un inicio de la transcripción inducido o aumentado en respuesta a un estímulo químico (para una revisión, véase Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108), ambiental o físico o puede ser "inducible por estrés", es decir, se activa cuando se expone a una planta a diversas condiciones de estrés o uno "inducible por patógenos", es decir, se activa cuando se expone a una planta a varios patógenos. Un promotor específico de órgano o tejido es uno que es capaz de iniciar la transcripción preferencialmente en ciertos órganos o tejidos, tales como las hojas, raíces, tejido de semilla, etc. Por ejemplo, un "promotor específico de raíz" es un promotor que está transcripcionalmente activo predominantemente en las raíces de la planta, sustancialmente hasta su exclusión en cualquier otra parte de una planta, aunque se permite cualquier expresión residual en estas otras partes de plantas. Los promotores capaces de iniciar la transcripción en ciertas células únicamente se citan en el presente documento como "específicos de células". Un promotor específico de semillas está transcripcionalmente activo predominantemente en el tejido de las semillas, pero no necesariamente de manera exclusiva en el tejido de las semillas (en los casos de expresión residual). El promotor específico de semillas puede estar activo durante el desarrollo de la semilla y/o durante la germinación. El promotor específico de semillas puede ser específico de endospermo/aleurona/embrión. Se proporcionan ejemplos de promotores específicos de semillas en Qing Qu y Takaiwa (Plant Biotechnol. J. 2, 1 13-125, 2004), cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia como si se expusiese en su totalidad. Un promotor específico de tejidos verdes, tal como se define en el presente documento, es un promotor que está transcripcionalmente activo predominantemente en los tejidos verdes, sustancialmente hasta su exclusión en cualquier otra parte de una planta, aunque se permite cualquier expresión residual en estas otras partes de plantas.

El término "terminador" abarca una secuencia de control que es una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala el procesamiento 3' y la poliadenilación de un transcrito primario y la terminación de la transcripción. El terminador puede proceder de un gen natural, procedente de una serie de diferentes genes de plantas o de ADN-T. El terminador que se vaya a añadir puede proceder, por ejemplo, de los genes de nopalina sintasa o de octopina sintasa o como alternativa de otro gen de planta o menos preferentemente, de cualquier otro gen de eucariota.

"Marcador de selección", "gen marcador de selección" o "gen indicador" incluye cualquier gen que confiere un fenotipo a una célula en la que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que están transfectadas o transformadas con una construcción de ácido nucleico de la invención. Estos genes marcadores permiten la identificación de una transferencia exitosa de las moléculas de ácido nucleico a través de una serie de principios diferentes. Pueden seleccionarse marcadores adecuados de entre los marcadores que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten la selección visual. Algunos ejemplos de genes marcadores de selección incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos (tales como nptII, que fosforila la neomicina y la kanamicina o hpt, que fosforila la higromicina o genes que confieren resistencia a, por ejemplo, bleomicina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, geneticina (G418), espectinomycin o blasticidina), a herbicidas (por ejemplo, bar que proporciona resistencia a Basta®; aroA o gox que proporcionan resistencia contra el glifosato o los genes que confieren resistencia a, por ejemplo, imidazolinona, fosfinotricina o sulfonilurea) o genes que proporcionan un rasgo metabólico (tal como manA, que permite a las plantas usar manosa como única fuente de carbono o xilosa isomerasa, para la utilización de la xilosa o marcadores antinutritivos, tales como la resistencia a 2-desoxiglucosa). La expresión de genes marcadores visuales da como resultado la formación de color (por ejemplo β -glucuronidasa, GUS o β -galactosidasa con sus sustratos coloreados, por ejemplo X-Gal), luminiscencia (tal como el sistema de luciferina/luciferasa) o fluorescencia (proteína verde fluorescente, GFP y derivados de la misma). Esta lista representa únicamente un pequeño número de los posibles marcadores. El experto estará familiarizado con dichos marcadores. Se prefieren marcadores distintos, dependiendo del organismo y del método de selección.

Se sabe que tras la integración estable o transitoria de ácidos nucleicos en células vegetales, solo una minoría de las células capta el ADN extraño y, si se desea, se integra en su genoma, dependiendo del vector de expresión usado y de la técnica de transfección usada. Para identificar y seleccionar estos integrantes, normalmente se introduce un gen marcador de selección (tal como los descritos anteriormente) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Estos marcadores pueden usarse, por ejemplo, en mutantes en los que estos genes no son funcionales mediante, por ejemplo, eliminación por métodos convencionales. Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican un marcador de selección pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que comprende la secuencia que codifica los polipéptidos de la invención o usados en los métodos de la invención o si no, en un vector separado. Las células que se han transfectado de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse, por ejemplo, mediante selección (por ejemplo, las células que han integrado el marcador de selección sobreviven, mientras que las demás células mueren).

Ya que los genes marcadores, en particular los genes para la resistencia a antibióticos y herbicidas, dejan de ser necesarios o deseados en la célula hospedadora transgénica una vez que se han introducido con éxito los ácidos nucleicos, el proceso de acuerdo con la invención para introducir los ácidos nucleicos emplea ventajosamente técnicas que permiten la eliminación o escisión de estos genes marcadores. Uno de estos métodos es lo que se conoce como co-transformación. El método de la co-transformación emplea dos vectores simultáneamente para la transformación, un vector que porta el ácido nucleico de acuerdo con la invención y un segundo que porta los genes marcadores. Una gran proporción de los transformantes recibe o, en el caso de las plantas, comprende (hasta un 40% o más de los transformantes), ambos vectores. En el caso de transformación con *Agrobacterium*, los

transformantes reciben normalmente solo una parte del vector, es decir, la secuencia flanqueada por el ADN-T, que normalmente representa el casete de expresión. Después, pueden eliminarse los genes marcadores de la planta transformada efectuando cruces. En otro método, se usan genes marcadores integrados en un transposón para la transformación junto con el ácido nucleico deseado (conocido como tecnología Ac/Ds). Los transformantes pueden cruzarse con una fuente de transposasa o los transformantes se transforman con una construcción de ácido nucleico que confiere expresión de una transposasa, transitoria o estable. En algunos casos (aproximadamente un 10%), el transposón sale del genoma de la célula hospedadora una vez que se ha producido con éxito la transformación y se pierde. En un número de casos adicionales, el transposón salta a una ubicación distinta. En estos casos, el gen marcador ha de eliminarse efectuando cruzamientos. En microbiología, se desarrollaron técnicas que hacen posible o facilitan, la detección de dichos eventos. Un método ventajoso adicional se basa en lo que se conoce como sistemas de recombinación; su ventaja es que la eliminación por cruzamiento puede evitarse. El sistema de este tipo mejor conocido es lo que se conoce por el sistema Cre/lox. Cre1 es una recombinasa que elimina las secuencias ubicadas entre las secuencias de loxP. En caso de que el gen marcador se integre entre las secuencias de loxP, se elimina una vez que se ha producido la transformación con éxito, mediante la expresión de la recombinasa. Algunos sistemas de recombinación adicionales son los sistemas HIN/HIX, FLP/FRT y REP/STB (Tribble et al., J. Biol. Chem., 275, 2000: 22255-22267; Velmurugan et al., J. Cell Biol., 149, 2000: 553-566). Es posible una integración de sitio específico en el genoma de una planta de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

A efectos de la presente invención, "transgénico", "transgén" o "recombinante" significan con respecto a, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, una construcción génica o un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico o un organismo transformado con las secuencias de ácido nucleico, los casetes de expresión o los vectores de acuerdo con la invención.

A efectos de la presente invención, se entiende que una planta transgénica significa, como antes, que los ácidos nucleicos usados en el método de la invención (por ejemplo, los genes artificiales) no están presentes en o se originan en, el genoma de dicha planta o están presentes en el genoma de dicha planta pero no en su locus natural en el genoma de dicha planta, siendo posible que los ácidos nucleicos se expresen de manera homóloga o heteróloga. Sin embargo, como se ha mencionado, transgénico también significa que, aunque los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o usados en el método de la invención se encuentran en su posición natural en el genoma de una planta, la secuencia se ha modificado respecto de la secuencia natural y/o que las secuencias reguladoras de las secuencias naturales se han modificado. Preferentemente, transgénico se interpreta como la expresión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en un locus no natural en el genoma, es decir, se produce la expresión homóloga o heteróloga de los ácidos nucleicos. En el presente documento se mencionan las plantas transgénicas preferidas.

El término "expresión" o "expresión génica" significa la transcripción de un gen específico o de genes específicos o de una construcción génica específica. En particular, el término "expresión" o "expresión génica" significa la transcripción de un gen o genes o una construcción genética en ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARNm con o sin la traducción posterior del último en una proteína. El proceso incluye la transcripción del ADN y el procesamiento del producto de ARNm resultante.

La expresión "expresión aumentada" o "sobreexpresión", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier forma de expresión que sea adicional al nivel de expresión de tipo silvestre original. A efectos de la presente invención, el nivel de expresión de tipo silvestre original también podría ser cero, es decir, ausencia de expresión o expresión no medible.

Los métodos para aumentar la expresión de genes o de productos génicos se encuentran bien documentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, sobreexpresión dirigida por promotores adecuados (tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento), el uso de potenciadores de la transcripción o potenciadores de la traducción. Pueden introducirse ácidos nucleicos aislados que sirven como promotor o potenciador en una posición adecuada (normalmente cadena arriba) de una forma no heteróloga de un polinucleótido a fin de regular positivamente la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. En caso de que se desee la expresión de polipéptido, generalmente es deseable incluir una región de poliadenilación en el extremo 3' de una región codificante de polinucleótido. La región de poliadenilación puede proceder de un gen natural, procedente de una serie de diferentes genes de plantas o de ADN-T. La secuencia 3' terminal que se vaya a añadir puede proceder, por ejemplo, de los genes de nopalina sintasa o de octopina sintasa o como alternativa de otro gen de planta o menos preferentemente, de cualquier otro gen de eucariota.

También puede añadirse una secuencia intrónica a la región 5' no traducida (UTR) o a la secuencia codificante de la secuencia codificante parcial para aumentar la cantidad de mensaje maduro que se acumula en el citosol. La inclusión de un intrón cortable y empalmable en la unidad de transcripción en construcciones de expresión tanto en plantas como en animales ha mostrado aumentar la expresión génica a nivel tanto de ARNm como de proteína hasta 1000 veces (Buchman y Berg (1988) Mol. Cell Biol. 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) Genes Dev 1:1 183-1200). Dicho potenciamiento intrónico de la expresión génica es generalmente mayor cuando se sitúa próximo al extremo 5' de la unidad de transcripción. El uso de los intrones de maíz Adh1 -S, intrón 1,2 y 6, el intrón Bronce-1, se conoce en la técnica. Para información general, véase: The Maize Handbook, Capítulo 1 16, Freeling y Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994).

El término "introducción" o "transformación", tal como se cita en el presente documento, abarca la transferencia de un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora, independientemente del método usado para la transferencia. El tejido vegetal capaz de propagarse posteriormente de manera clonal, ya sea mediante organogénesis o embriogénesis, puede transformarse con una construcción genética de la presente invención y regenerarse una planta completa a partir del mismo. El tejido concreto seleccionado variará dependiendo de los sistemas de

propagación clonal disponibles y más adecuados para la especie particular que se esté transformando. Algunos tejidos diana ejemplares incluyen discos foliares, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, megagametofitos, tejido de callo, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemo apical, brotes axilares y meristemas radiculares) y tejido de meristemo inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo de hipocótilo). El polinucleótido puede introducirse de manera transitoria o estable en una célula hospedadora y puede mantenerse no integrado, por ejemplo, en forma de un plásmido. Como alternativa, puede integrarse en el genoma del hospedador. La célula vegetal transformada resultante puede usarse después para regenerar una planta transformada de un modo conocido por los expertos en la materia.

La transferencia de genes exógenos al genoma de una planta se denomina transformación. La transformación de especies de plantas es en la actualidad una técnica prácticamente rutinaria. De manera ventajosa, puede usarse cualquiera de diversos métodos de transformación para introducir el gen de interés en una célula ancestral adecuada. Los métodos descritos para la transformación y regeneración de plantas a partir de tejidos vegetales o de células vegetales pueden utilizarse para transformación transitoria o estable. Los métodos de transformación incluyen el uso de liposomas, electroporación, agentes químicos que aumentan la captación de ADN libre, inyección de ADN directamente en la planta, bombardeo con pistolas de partículas, transformación usando virus o polen y microproyectiles. Los métodos pueden seleccionarse de entre el método de calcio/poli-etilenglicol para protoplastos (Krens, F.A. et al., (1982) *Nature* 296, 72-74; Negrutiu I et al. (1987) *Plant Mol Biol* 8: 363-373); electroporación de protoplastos (Shillito R.D. et al. (1985) *Bio/Technol* 3, 1099-1 102); microinyección en material vegetal (Crossway A et al., (1986) *Mol. Gen Genet* 202: 179-185); bombardeo con partículas recubiertas de ADN o ARN (Klein TM et al., (1987) *Nature* 327: 70) infección con virus (no integrativos) y similares. Las plantas transgénicas, incluyendo plantas de cultivo transgénicas, se producen preferentemente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Un método de transformación ventajoso es la transformación en la planta. Para este fin, es posible, por ejemplo, permitir que las agrobacterias actúen sobre semillas de plantas o inocular el meristemo de la planta con agrobacterias. Ha demostrado ser bastante rápido de acuerdo con la invención dejar que una suspensión de agrobacterias transformadas actúe sobre la planta intacta o al menos sobre las flores principales. Posteriormente, se cultiva la planta hasta que se obtienen las semillas de la planta tratada (Clough y Bent, *Plant J.* (1998) 16, 735-743). Los métodos para la transformación mediada por *Agrobacterium* de arroz incluyen métodos bien conocidos para la transformación del arroz, tales como aquellos descritos en cualquiera de los siguientes: Solicitud de Patente Europea EP1198985, Aldemita y Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491 -506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271 -282, 1994) cuyas divulgaciones se incorporan al presente documento por referencia como si se hubiesen expuesto en su totalidad. En el caso de la transformación del maíz, el método preferido es como el descrito en Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996) o en Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002) cuyas divulgaciones se incorporan al presente documento por referencia como si se hubiesen expuesto en su totalidad. Dichos métodos se describen adicionalmente, a modo de ejemplo, en B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, eds. S.D. Kung y R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 y en Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Los ácidos nucleicos o la construcción que se va a expresar se clona preferentemente en un vector, que es adecuado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo pBin19 (Bevan et al (1984) *Nucl. Acids Res.* 12-8711). Las agrobacterias transformadas mediante dicho vector pueden usarse a continuación de un modo conocido para la transformación de plantas, tales como plantas usadas como modelo, tales como *Arabidopsis* o plantas de cultivo tales como, a modo de ejemplo, plantas de tabaco, por ejemplo, sumergiendo hojas raspadas u hojas cortadas en una solución de agrobacterias y después cultivándolas en un medio adecuado. La transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* se describe, por ejemplo, por Hofgen y Willmitzer en *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 o se conoce, entre otras cosas, a partir de F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; en *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, eds. S.D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, págs. 15-38.

Además de la transformación de células somáticas, que después se tienen que regenerar en plantas intactas, también es posible transformar las células de meristemas vegetales y en particular, aquellas células que se desarrollan en gametos. En este caso, los gametos transformados siguen el desarrollo natural de la planta, dando lugar a plantas transgénicas. Por lo tanto, por ejemplo, las semillas de *Arabidopsis* se tratan con agrobacterias y se obtienen semillas a partir de las plantas en desarrollo, de las cuales una cierta proporción se ha transformado y es, por tanto, transgénica [Feldman, KA y Marks MD (1987). *Mol Gen Genet* 208:1 -9; Feldmann K (1992). en: C Koncz, N-H Chua y J Shell, eds, *Methods in Arabidopsis Research*. Word Scientific, Singapur, págs. 274-289]. Algunos métodos alternativos están basados en la eliminación repetida de inflorescencias y la incubación del sitio de escisión en el centro de la roseta con agrobacterias transformadas, mediante lo cual, las semillas transformadas pueden igualmente obtenerse en un momento posterior (Chang (1994). *Plant J.* 5: 551 -558; Katavic (1994). *Mol Gen Genet*, 245: 363-370). Sin embargo, un método especialmente eficaz es el método de infiltración al vacío con sus modificaciones, tales como el método de la "inmersión floral". En el caso de la infiltración al vacío de *Arabidopsis*, se trata a las plantas intactas a presión reducida con una suspensión de agrobacterias [Bechthold, N (1993). *CR Acad Sci Paris Life Sci*, 316: 1 194-1 199], mientras que en el caso del método de "inmersión floral", el tejido floral en desarrollo se incuba brevemente con una suspensión de agrobacterias tratada con tensioactivo [Clough, SJ y Bent AF (1998) *The Plant J.* 16, 735-743]. En ambos casos, se recoge una cierta proporción de semillas transgénicas y estas semillas pueden distinguirse de las semillas no transgénicas por crecer en las condiciones selectivas anteriormente descritas. Además, la transformación estable de plastidios es ventajosa debido a que los plastidios se heredan por vía maternal en la mayoría de cultivos, reduciendo o eliminando el riesgo de flujo de transgenes a través del polen. La transformación del genoma de los cloroplastos se logra generalmente mediante un proceso que se ha presentado esquemáticamente en Klaus et al., 2004 [*Nature Biotechnology* 22 (2), 225-229]. Brevemente, las

secuencias que se van a transformar se clonan junto con un gen marcador de selección de entre secuencias flanqueantes homólogas al genoma del cloroplasto. Estas secuencias homólogas flanqueantes dirigen la integración de sitio específico en el plastoma. La transformación de plastidios se ha descrito para muchas especies de plantas distintas y se proporciona una descripción general en Bock (2001), Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol.* 21 de septiembre de 2001; 312 (3):425-38 o Maliga, P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol.* 21, 20-28. Recientemente se ha publicado un avance biotecnológico adicional en forma de plastidios transformantes sin marcador, que pueden producirse mediante un gen marcador co-integrado (Klaus et al., 2004, *Nature Biotechnology* 22(2), 225-229).

Las células vegetales modificadas genéticamente pueden regenerarse mediante todos los métodos familiares para un experto en la materia. Los métodos adecuados pueden incorporarse en las publicaciones anteriormente mencionadas de S.D. Kung y R. Wu, Potrykus o Hofgen y Willmitzer. Generalmente, después de la transformación, las células vegetales o los agrupamientos celulares se seleccionan respecto de la presencia de uno o más marcadores que están codificados por genes expresables en plantas transferidos junto con el gen de interés, tras lo cual el material transformado se regenera en una planta completa. Para seleccionar plantas transformadas, el material vegetal obtenido en la transformación, por norma general, se somete a condiciones selectivas de tal forma que puedan distinguirse las plantas transformadas de las plantas no transformadas. Por ejemplo, las semillas obtenidas del modo anteriormente descrito pueden plantarse y, después de un periodo de crecimiento inicial, someterse a una selección adecuada por rociado. Una posibilidad adicional es cultivar las semillas, en caso adecuado después de la esterilización, sobre placas de agar usando un agente de selección adecuado, de tal forma que solo puedan crecer y convertirse en plantas las semillas transformadas. Como alternativa, las plantas transformadas se seleccionan respecto de la presencia de un marcador de selección, tal como aquellos descritos anteriormente. Después de la transferencia de ADN y de la regeneración, también pueden evaluarse las plantas supuestamente transformadas, por ejemplo, usando análisis de Southern, respecto de la presencia del gen de interés, el número de copias y/o la organización genómica. Como alternativa o además, pueden controlarse los niveles de expresión del ADN recién introducido usando análisis de Northern y/o de Western, siendo ambas técnicas ampliamente conocidas por los expertos habituales en la materia.

Las plantas transformadas generadas pueden propagarse mediante diversos medios, tales como propagación clonal o técnicas de fitomejoramiento convencionales. Por ejemplo, puede autocruzarse una planta transformada de primera generación (o T1) y seleccionarse los transformantes homocigotos de segunda generación (o T2) y después, pueden propagarse adicionalmente las plantas de T2 mediante técnicas de fitomejoramiento convencionales. Los organismos transformados generados pueden adoptar diversas formas. Por ejemplo, pueden ser quimeras de células transformadas y células no transformadas; transformantes clonales (por ejemplo, todas las células transformadas para que contengan el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y no transformados (por ejemplo, en plantas, un esqueje de raíz transformado injertado en un vástago no transformado).

La selección de plantas de control adecuadas es una parte rutinaria de una situación experimental y puede incluir plantas de tipo silvestre correspondientes o plantas correspondientes sin el gen de interés. La planta de control es normalmente de la misma especie de planta o incluso de la misma variedad que la planta que se vaya a evaluar. La planta de control también puede usar un nulicigoto de la planta que se vaya a evaluar. Los nulicigotos son individuos que carecen del transgén por segregación. Una "planta de control", tal como se usa en el presente documento, se refiere no solo a plantas completas, sino también a partes de planta, incluyendo semillas y partes de semillas.

La expresión "casete de expresión" se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el fin de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención in vitro o in vivo, de manera constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo, además de células vegetales, células procariotas, de levadura, fúngicas, de insecto o de mamífero. El término incluye sistemas de expresión lineales y circulares. El término incluye todos los vectores. Los casetes pueden permanecer episómicos o integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Los casetes de expresión pueden tener la capacidad de auto-replicarse o no (es decir, impulsan únicamente la expresión transitoria en una célula). El término incluye casetes de expresión recombinantes que contienen únicamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

De acuerdo con realizaciones alternativas, las moléculas se administran a las plantas tal cual y no en forma de un transgén. Ya que las plantas no tienen un sistema digestivo, el término administración, en este caso particular, también prevé aplicaciones tópicas de las moléculas (proporcionar las moléculas sobre la planta en lugar de dentro de la planta) o vías de administración indirectas (por ejemplo, proporcionar las moléculas en el suelo, de tal forma que puedan captarse por las raíces de la planta). Aunque esta vía de administración es particularmente adecuada para abordar infecciones en plantas, también puede aplicarse para regular a la baja proteínas vegetales.

Las moléculas pueden proporcionarse tal cual, en forma de una composición agroquímica. Sin embargo, normalmente, las moléculas para su uso en plantas (o los ácidos nucleicos que los codifican) pueden proporcionarse en forma de una composición junto con un vehículo agrícolamente aceptable (en lugar de un vehículo farmacéuticamente aceptable). Por "vehículo agrícolamente aceptable" se entiende una carga sólida o líquida, diluyente o sustancia de encapsulación que pueda usarse de manera segura en la administración tópica o sistémica de una molécula interferidora a una planta, semilla de planta, célula vegetal o protoplasto de planta. Las moléculas para aplicaciones en plantas descritas en el presente documento, combinadas con un vehículo agrícolamente aceptable, también se refieren a una formulación agroquímica o una composición agroquímica. Una "formulación agroquímica", tal como se usa en el presente documento, significa una composición para uso agrícola u hortícola, que comprende un principio activo (es decir, al menos una molécula, tal como se describe en el presente

documento), opcionalmente con uno o más aditivos que favorezcan una óptima dispersión, atomización, humectación de la hoja, distribución, retención y/o captación de agentes agroquímicos. A modo de ejemplo no limitante, dichos aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes dispersantes, aceites, adherentes, penetrantes, agentes tamponadores, acidificantes, agentes desespumantes o agentes de control de la acumulación. Un "agroquímico", tal como se usa en el presente documento, incluye no solo compuestos o formulaciones de compuestos que sean fáciles de usar, sino también precursores en forma inactiva, que pueden activarse mediante factores externos. A modo de ejemplo no limitante, el precursor puede activarse por cambios de pH, causados por heridas en las plantas tras un daño causado por insectos, mediante acción enzimática causada por un ataque fúngico o mediante cambios de temperatura o cambios de humedad. Los agroquímicos, tal como se usa en el presente documento, no solo incluyen agentes (por ejemplo, plaguicidas, reguladores del crecimiento, nutrientes/fertilizantes, repelentes, exfoliantes, etc.) que son adecuados y/o están pensados para su uso en campos de cultivo (agricultura), pero también incluye agentes (por ejemplo, plaguicidas, reguladores del crecimiento, nutrientes/fertilizantes, repelentes, exfoliantes, etc.) que están pensados para su uso en cultivos de invernadero (horticultura/floricultura) e incluso agentes que son adecuados y/o están pensados para usos no de cultivo, tales como usos en jardines privados, usos domésticos (por ejemplo, herbicidas o insecticidas para uso doméstico) o usos por operarios de control de plagas (por ejemplo, control de malas hierbas, etc.). Preferentemente, dicho agroquímico o combinación de agroquímicos se selecciona de entre el grupo que consiste en herbicidas (por ejemplo, una molécula con una región Y_i dirigida contra proteínas de malas hierbas), insecticidas (por ejemplo, una molécula con una región Y_i dirigida contra proteínas de insectos), fungicidas (por ejemplo, una molécula con una región Y_i dirigida contra proteínas de mohos), nematocidas (por ejemplo, una molécula con una región Y_i dirigida contra proteínas de nematodos), biocidas (por ejemplo, una molécula con una región Y_i dirigida contra proteínas de patógenos) o compuestos reguladores del crecimiento de plantas (por ejemplo, una molécula con una región Y_i dirigida contra proteínas de la planta a la que se administra). Los principios activos adicionales (que no son moléculas descritas en el presente documento) se seleccionan particularmente de entre herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, micronutrientes o compuestos reguladores del crecimiento de plantas. En particular, dicha composición agroquímica de la invención puede comprender una microcápsula, microesfera, nanocápsula, nanoesfera, liposomas o vesículas, etc. en los que uno o más agroquímicos, de manera adecuada, se encapsulan, atrapan, insertan, incorporan o de otro modo incluyen; y uno o más agentes de direccionamiento, comprendiendo cada uno de estos uno o más dominios de unión para unirse a uno o más antígenos presentes en o sobre dicho sitio de unión o que forma dichos uno o más sitios de unión en dicha planta o partes de una planta, tal como una hoja, tallo, flor, fruto, bulbo o tubérculo de una planta). El vehículo con los uno o más agentes de direccionamiento unidos, acoplado o de otro modo unido al mismo o asociado con el mismo puede disolverse, emulsionarse, suspenderse o dispersarse o de otro modo incluirse en un medio líquido adecuado (tal como agua u otro medio acuoso, orgánico u oleoso) para proporcionar una solución (concentrada), suspensión, dispersión o emulsión que pueda almacenarse y (en caso necesario, tras una dilución adicional) aplicarse a una planta, a una o más partes de una planta (tales como hojas, tallo, raíces, frutos, conos, flores, bulbos o tubérculos) o a las cercanías de una planta (por ejemplo, al suelo en el que crece la planta), por ejemplo, mediante rociado, vertido, goteo, cepillado, recubrimiento por goteo o cualquier otra técnica adecuada. Posteriormente, la composición puede unirse a o sobre el sitio de unión (o a uno o más antígenos presentes en o sobre dicho sitio de unión o que forman dicho sitio de unión, tales como tricomas, estomas, cutícula, lenticelas, acículas, espinas o capa de cera) a través de uno o más dominios de unión que forman parte de los agentes de direccionamiento comprendidos en la composición, preferentemente de una manera dirigida. Posteriormente, los agroquímicos se liberan del vehículo (por ejemplo, debido a la degradación del vehículo o al transporte pasivo a través de la pared de la microcápsula, microesfera, nanocápsula, nanoesfera, liposoma o vesícula, etc.) de tal forma que pueden proporcionar las acciones agroquímicas deseadas. Como alternativa al uso de un vehículo, el agroquímico o la combinación de agroquímicos también puede proporcionarse en forma de partículas (pequeñas) que se proporcionan con un recubrimiento adecuado o una capa (externa) a la que se acopla o puede unirse el agente de acoplamiento y que también puede servir para estabilizar o mejorar la integridad física o la estabilidad de las partículas. Como otra alternativa, el agroquímico o la combinación de agroquímicos puede mezclarse de manera adecuada con un excipiente o aglutinante al que puede unirse o acoplarse el agente de direccionamiento y que nuevamente puede servir también para estabilizar o mejorar la integridad física o la estabilidad de las partículas. Dichas partículas recubiertas o compuestas se encuentran preferentemente en forma de una suspensión, torta húmeda o polvo de flujo libre, comprimido, cápsula o líquido concentrado (tal como una emulsión, suspensión, dispersión).

Cabe destacar que aunque se han descrito en el presente documento realizaciones particulares, configuraciones específicas, así como materiales y/o moléculas, para células y métodos de acuerdo con la presente invención, pueden efectuarse diversos cambios o modificaciones en cuanto a la forma y detalle sin desviarse del alcance de la presente invención. Los ejemplos siguientes se proporcionan a fin de ilustrar mejor realizaciones particulares y no deben considerarse limitantes de la solicitud. La solicitud solo se limita por las reivindicaciones.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se resaltan diferentes aplicaciones de la tecnología de interferidores. La utilidad de las presentes moléculas en el tratamiento de enfermedades infecciosas se ilustra en los ejemplos 1 a 3, relacionados con aplicaciones antifúngicas, antibacterianas y antivíricas, respectivamente. El ejemplo 1 detalla cómo puede tratarse o prevenirse el crecimiento de biofilms y también demuestra la regulación a la baja de la resistencia al estrés

en levaduras. El ejemplo 2 muestra que múltiples especies bacterianas, incluyendo especies resistentes a antibióticos, pueden eliminarse de manera eficaz sin ser tóxico para células de mamífero. Además, El ejemplo 2 muestra la viabilidad de la administración in vivo de los péptidos para tratar infecciones. El ejemplo 3 caracteriza la identificación de moléculas interferidoras dirigidas contra diferentes proteínas víricas de la gripe.

5 En el ejemplo 4 se ilustran diferentes formas en las que pueden usarse las presentes moléculas en la detección de proteínas (variando desde proteínas bacterianas hasta humanas) y cómo puede aplicarse esto al diagnóstico de enfermedades mediante detección de biomarcadores en muestras complejas.

10 El ejemplo 5 detalla aplicaciones para enfermedades no infecciosas, mostrando la agregación específica de dos tirosina cinasas receptoras bien conocidas, implicadas en el cáncer y la AMD. También demuestra el concepto de modulación de la función inmunitaria usando las moléculas interferidoras descritas en el presente documento.

15 Finalmente, el ejemplo 6 demuestra que las presente moléculas también pueden aplicarse para lograr la regulación a la baja de proteínas en plantas.

1. Aplicaciones antifúngicas

1.1 Introducción

20 *Candida albicans* forma parte de la flora humana normal y crece en las superficies mucosas en individuos sanos. En hospedadores susceptibles, este organismo fúngico puede provocar enfermedad diseminada tanto mucosa como hematógena. Para que *C. albicans* persista en el hospedador e induzca enfermedades, ha de ser capaz de adherirse a superficies bióticas y abióticas, invadir células hospedadoras y obtener hierro. La proteína Als3 específica de la superficie de la hifa de *C. albicans* es un miembro de la familia de proteínas similar a la secuencia de aglutinina (Als) y es importante en todos estos procesos (Hoyer LL et al (1998) Curr. Genet. 33(6): 451-9) y Liu Y et al (2011) Eukaryotic Cell. 10(2):168-73. Funcionando como adhesina, Als3 media el acoplamiento a células epiteliales, células endoteliales y proteínas de la matriz extracelular. También desempeña un papel importante en la formación de biofilms en superficies protésicas. Als3 es una de las dos invasinas conocidas de *C. albicans*. Se une a receptores de células hospedadoras, tales como E-cadherina y N-cadherina y de este modo, induce a las células hospedadoras a endocitar el organismo. Als3 también se une a la ferritina de la célula hospedadora y le permite a *C. albicans* utilizar esta proteína como fuente de hierro. Debido a sus múltiples funciones y su alto nivel de expresión *in vivo*, Als3 se considera una diana prometedoras para combatir infecciones por *Candida*. En el presente ejemplo, se aplicaron los productos y los métodos de la invención para dirigirse específicamente a la proteína Als3.

1.2 Expresión intracelular de interferidores específicos de Als3

40 Se usó el algoritmo de predicción de la beta-agregación, TANGO, para identificar la secuencia, LQQYTLLLIYLSVATAK (SEQ ID NO: 1) derivada de Als3 (ilustrada en la SEQ ID NO: 2), como secuencia con un alto potencial de formación de agregación. Este resto de 17 aminoácidos (SEQ ID NO: 1), correspondiente a los aminoácidos 2-18 en la SEQ ID NO: 2, se empleó como secuencia señuelo en las construcciones de interferidor intracelular. QQ y K actúan como restos constitutivos naturales (restos X₁ y X₂), YLLLLIYLSVATA (SEQ ID NO: 107) es, en este caso, la región Y₁. La secuencia de ADN, que codifica la SEQ ID NO: 1, se clonó en el vector de expresión en *C. albicans* pPCK1-GFP (Barelle et al., (2004) Yeast 21(4): 333-40) en fase con el gen de GFP (proteína verde fluorescente) optimizado para *C. albicans* y una secuencia de polienlazador, acoplado genéticamente además a una secuencia de ADN que codifica un reforzador de la agregación y un marcador de HA. Esta secuencia denominada reforzadora (RKLLFNL (SEQ ID NO: 68)) se una secuencia artificial con una alta propensión a la agregación. La secuencia RKLLFNL (SEQ ID NO: 68) muestra unión a DnaK y es una secuencia adaptada (la secuencia de tipo silvestre es RKLFFNL (SEQ ID NO: 69)) procedente del factor sigma 32 (véase McCarty J. et al (1996) J. Mol. Bio. 256, 829-837). La expresión de la construcción de fusión completa se encontraba bajo el control del promotor *PCK1*. El gen *PCK1* se reprime mediante glucosa y codifica PEP carboxinasa mediante fuentes de carbono gluconeogénicas, tales como ácidos o succinato (Leuker et al (1997) Gene 192: 235-240).

55 SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de Als3 de *Candida albicans*

1 mlqqytlili ylsvatakti tgvfnsfnsl twsnaatyny kpggtpwna vlgwslgdts
 61 aspgdtftln mpcvfkftts qtsvdltagh vkyatcqfqa geefmtfstl tctvsntltp
 121 sikalgtvtl plafnvggtg ssvdledskc ftagntvtf ndggkkisin vdfersndp
 181 kgyltdsrvi pslnkvstlf vapqcangyt sgtmgfanty gdvqidcsni hvgitkglnd
 241 wnyvpssesf sytktcssng ifityknvpa gyprfvdaiy satdvnsytl syaneytcag
 301 gywqrapftl rwtgyrnsda gsnigivat trvtvdstta vttlfpdpr dktkieilk
 361 piptttitts yvgvttsyst ktapigetat vivdipyhtt ttvtskwtgt itstthtntp
 421 tdsidtvivq vpspnptvt teywsqsfat tttitgppgn tdtvliorepp nhtvtteyw
 481 sesyttstf tappgtdsv iikeppnptv ttteywsesy tttvtapp ggdvtviire
 541 ppnhtvtte ywsqsyttt tviappgtd sviireppnp tvttteywsq syatttita
 601 ppgetdvtli reppnhtvt teywsqsyat tttitappge tdtvliorepp nhtvtteyw
 661 sqsyttttv iappgtdsv iikeppnptv ttteywsqsy atttitapp getdvtlire
 721 ppnhtvtte ywsqsyatt titappgetd tvlioreppnh tvttteywsq sfatttvt
 781 ppgtdtvii reppnhtvt teywsqsfat tttvappgg tdtvliorepp nptvtteyw
 841 sqpyttttv iappgtdtv iydmsse issfsrphyt nht

5 El plásmido, que comprende el casete de expresión, se linealizó en el locus RPS10 antes de la transformación de la cepa CA14 de *C. albicans* (Fonzi e Irwin (1993) Genetics 134: 717-728). Los transformantes se generaron y se confirmó mediante análisis PCR que comprendían el casete de expresión. Tres transformantes independientes, AFA16a, AFA16b y AFA16c (que expresan GFP + reforzadores + secuencia señuelo) se usaron en los experimentos posteriores. Como control negativo, se usó un recombinante que comprendía el mismo plásmido, pero que carecía de la secuencia señuelo específica. Esto dio como resultado la cepa de control, AFA15a (que expresaba GFP + reforzadores). Para identificar la localización del péptido señuelo, se usó la expresión de GFP. Todas las cepas se cultivaron una noche en condiciones represoras. A continuación, las células se transfirieron a medio YNB, pH 6,5 complementado con D-glucosa al 4% (condiciones represoras del promotor) o al mismo medio complementado con casaminoácidos (condiciones inductoras del promotor). Se efectuó un seguimiento de la expresión de la construcción interferidora mediante un ensayo de fluorescencia de GFP tras 1 h, 2 h, 3 h y 5 h. En condiciones represoras, no pudo detectarse fluorescencia de GFP (datos no mostrados).

15 *C. albicans* AFA15a mostró la presencia de una señal intracelular, difusa de GFP, en lugar de una localización directa dentro del compartimento celular. Sin embargo, las cepas recombinantes de *C. albicans* que comprendían las construcciones interferidoras presentaron loci puntuales, especificados como agregados de anti-proteína Als3 dentro del citosol. Este fenómeno se mostró ya a las 2h después de la inducción y proliferó en los puntos de tiempo posteriores. Con el paso del tiempo, la cantidad de puntos aumentó en un intervalo de 1 a 3 por célula. Los puntos de tiempo posteriores indicaron la misma proporción de focos, de manera similar a la obtenida después de 5 h (datos no mostrados). Esto indicó, que la presencia de las secuencias señuelo interferidoras cortas da como resultado una agregación inducida.

25 1.2.1 Formación de biofilms *in vitro*

Ya que se sabe que Als3 es importante para la adhesión y la formación de biofilms, también se usaron cepas recombinantes en experimentos de biofilms que se efectuaron *in vitro*. La hipótesis de partida fue que las cepas de *C. albicans* que expresan la construcción interferidora tenían fenotipos similares en cuanto a la adhesión y la formación de biofilms respecto de los obtenidos con el mutante de eliminación *C. albicans ALS3*. Las cepas recombinantes que expresaban los interferidores se evaluaron respecto de su capacidad para formar biofilms *in vitro* sobre discos de silicona cuadrados. Se obtuvieron biofilms maduros (48 h) después de su crecimiento en YNB, pH 6,5 con succinato o D-glucosa al 4% como fuente de carbono. Posteriormente, se determinó la arquitectura del biofilm mediante microscopía de fluorescencia. Se observó que *C. albicans* AFA15a proliferó en 48 h, dando como resultado una unión robusta y una arquitectura de biofilm madura por toda la superficie de silicona, independientemente del crecimiento en condiciones inducidas o reprimidas. De manera importante, *C. albicans* SC5314 (tipo silvestre de *C. albicans*, citado por Gillum et al (1984) Mol Gen Genet 198:179-182) desarrolló un biofilm maduro equivalente al de AFA15a (datos no mostrados). Por otro lado, la inducción de la expresión de construcciones interferidoras de Als3 dio como resultado una adhesión fuertemente reducida y una formación de biofilms caracterizados por áreas negras sin células unidas. Dicho desarrollo rudimentario de biofilms es similar al producido por el mutante homocigoto para Als3 de *C. albicans als3Δ/als3Δ*. Los tres transformantes independientes fueron capaces de formar biofilms maduros de manera similar a AFA15a, cuando se cultivaron en YNB, D-glucosa al 4%. Además de microscopía de fluorescencia, los biofilms se cuantificaron por las unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos se presentan en la figura 3.

La cuantificación de biofilms era claramente acorde a las observaciones obtenidas a partir de la microscopía de fluorescencia de GFP. Tal como se esperaba, las cepas de control (*C. albicans* SC5314 y AFA15a) produjeron biofilms maduros en las dos condiciones de cultivo. Por el contrario, los recombinantes que expresaban los interferidores de Als3 de *C. albicans*, de manera significativa, no lograron formar biofilms ($p < 0,001$) (se observó una inhibición de prácticamente el 80%) en comparación con la cepa de tipo silvestre, mientras que cuando se cultivaron en condiciones represoras, recuperaron su función y produjeron biofilms similares a los de las cepas de control (formación de biofilms prácticamente del 100%). Estos resultados apoyan el hecho, de que la agregación de proteínas inducida de Als3 dio como resultado una pérdida de su función y los recombinantes que expresan los interferidores tienen un fenotipo similar al obtenido con la cepa *C. albicans als3Δ/als3Δ*.

30 1.2.2 Adherencia e invasión de células epiteliales humanas

Además de tener un papel en la adhesión, Als3 también está implicado en la invasión de células epiteliales y endoteliales humanas. Por lo tanto, en una etapa posterior, se estudió la capacidad de las cepas recombinantes de *C. albicans* para adherirse e invadir células epiteliales humanas de cepas de control de *C. albicans* (SC5314 y AFA15a) y cepas recombinantes que expresan los interferidores (AFA16a, AFA16b and AFA16c) se cultivaron en condiciones inductoras/represoras durante una noche. *C. albicans als3Δ/als3Δ* se usó como control. La puesta en contacto de *Candida* con células epiteliales se evaluó tras 1 h, mientras que la invasión se monitorizó después de 3 h. El porcentaje de células fúngicas adheridas e invadidas se muestra en la figura 4A y B.

La capacidad de cepas de *Candida albicans* que expresan la construcción interferidora de Als3 para (A) adherirse y (B) para invadir la línea celular epitelial TR-146. Las cepas se incubaron durante una noche en YNB, pH 6,5 complementado con succinato, (barras blancas) o en YNB, pH 6,5, D-glucosa al 4% (barras negras). Ambos ensayos se realizaron en DMEM que contenía NaHCO_3 , D-glucosa, piruvato de sodio y glutamina sin FCS. La adherencia se llevó a cabo durante 1 h, mientras que la invasión durante 3 h, ambas a 37 °C, CO_2 al 5%. Después, se tificaron las células de *Candida* adheridas con blanco de calcoflúor y se calculó el porcentaje de células adheridas como la media de células de *Candida* unidas sobre cien áreas dispersas a lo largo de toda la superficie del cubreobjetos. Se determinó el porcentaje de células de *C. albicans* invasoras dividiendo el número de células internalizadas entre el número total de células adherentes. Se contaron al menos 100 células fúngicas sobre cada portaobjetos. Como cepa de control, se usó *C. albicans* SC5314 (100%) y *C. albicans als3Δ/als3Δ* como control negativo. Se determinó una diferencia significativa entre la adhesión/invasión de las cepas que expresan la construcción interferidora a células epiteliales, en comparación con el control, mediante $p < 0,001$ (*). Las desviaciones estándar se calcularon a partir de dos experimentos independientes.

La inducción del interferidor específico de Als3 en *C. albicans* dio lugar a una adhesión reducida a las células epiteliales en un intervalo del 40% al 50%, tal como se muestra en la figura 4A. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Es sorprendente que la cepa recombinante AFA16a se adhirió al mismo bajo nivel que *als3Δ/als3Δ* (véase la fig. 3A). Tal como se esperaba, el crecimiento recombinante en condiciones reprimidas (es decir, sin producción de interferidores de la proteína Als3) se comportó de manera similar a las cepas de control. La cepa AFA15a mostró una capacidad de adhesión comparable a *C. albicans* SC5314, independientemente de las condiciones usadas. A continuación, los recombinantes que portaban las construcciones interferidoras de Als3, mostraron una reducción de la invasión de aproximadamente el 40%, cuando se cultivaron en condiciones de inducción, mientras que el cultivo en condiciones represoras recuperó su función (véase la figura 4B). Tal como se esperaba, *C. albicans als3Δ/als3Δ* no logró invadir células epiteliales ($p < 0,001$).

En el presente ejemplo, se demuestra que la estrategia recombinante resulta ser un sistema fiable que puede usarse además para estudiar la agregación dirigida de proteínas de interés particulares.

1.3 La aplicación externa de péptidos interferidores de Als3 a *C. albicans* reduce la adhesión y la formación de biofilms

5 Ya que la proteína Als3 está ubicada en la pared celular, se investigó la posibilidad de inducir la agregación específica de Als3 mediante la aplicación exógena de interferidores específicos de Als3 a las células de *Candida*. Además de la secuencia usada en el casete de expresión recombinante (YTLLLIYLSV (SEQ ID NO: 70)), el algoritmo TANGO reveló secuencias de aminoácidos adicionales con una fuerte propensión a la agregación en Als3. Por lo tanto, también se predijo que el nonapéptido NGIVIVATT (SEQ ID NO: 71) y el péptido TWLCGLITLLSLF
10 (SEQ ID NO: 72) tenían altos potenciales de agregación (intervalo del 50% al 99% de propensión a la agregación). Se diseñaron varios derivados de estas secuencias de TANGO, se sintetizaron y se probaron. La tabla 1 representa los 23 péptidos diferentes usados.

15 Para aclarar los diseños de las moléculas haciendo referencia a la fórmula general propuesta en la solicitud, las moléculas E1 y E2 tenían n=1. Para E1, X₁ y X₂ son cada uno un resto de arginina, Y₁ es una serie de 9 restos presentes en la proteína Als3 y Z₁ está ausente. Obsérvese que esto puede decirse de manera equivalente como X₁ es RNG, X₂ es R e Y₁ es una secuencia de heptapéptido contigua presente en la proteína Als3. Sin embargo, ya que NG son los restos vecinos en la secuencia de Als3 (véase la SEQ ID NO: 2) y el nonapéptido cumple los requisitos de una serie Y₁, se prefiere la notación anterior. Para E2, X₁ es R y X₂ es K, Y₁ es una serie de 16 restos presentes
20 en la proteína Als3 y Z₁ está ausente.

F9 es una molécula donde n=2. X₁ es RK y X₂ es G, Y₁ es una secuencia sintética, Z₁ es S, X₃ y X₄ son cada uno un resto de arginina, Y₂ es una serie de 9 restos presentes en la proteína Als3 y Z₂ está ausente (es decir, la segunda parte de la molécula es idéntica a E1). Obsérvese que en esta molécula, X₁ e Y₁ forman juntos una secuencia artificial derivada del factor sigma 32 (véase McCarty J. et al (1996) J. Mol. Bio. 256, 829-837) con una alta propensión a la agregación.
25

Los siguientes 20 péptidos tienen un diseño similar, donde n=2, todos los restos X son un solo resto, tanto Y₁ como Y₂ son una secuencia que se produce en la proteína Als3, Z₁ es un enlazador de GS y Z₂ está ausente.
30

Tabla 1: Secuencias de los 23 péptidos interferidores que se probaron. Todas las secuencias se diseñaron mediante TANGO.

Marcador	Secuencia del péptido	Concentración probada
E1	RNGIVIVATTR (SEQ ID NO: 7)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
E2	RLQQYTLLLIYLSVATAK (SEQ ID NO: 8)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
F9	RKLLFNLGSRNGIVIVATTR (SEQ ID NO: 9)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_i	RNGIVIVATRGSRNGIVIVATR (SEQ ID NO: 10)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_2	RVIQHSTWLRGSRVIQHSTWLR (SEQ ID NO: 11)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_3	RLITLLSLFRGSRITLLSLFR (SEQ ID NO: 12)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_4	RQYTLLLIYRGSRQYTLLLIYR (SEQ ID NO: 13)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_5	KNGIVIVATKGSKNGIVIVATK (SEQ ID NO: 14)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_6	KVIQHSTWLKGSKVIQHSTWLK (SEQ ID NO: 15)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_7	KLITLLSLFKGSKLITLLSLFK (SEQ ID NO: 16)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_8	KQYTLLLIYKGSKQYTLLLIYK (SEQ ID NO: 17)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
P_9	DNGIVIVATDGSNDNGIVIVATD (SEQ ID NO: 18)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_10	DVIQHSTWLDGSDVIQHSTWLD (SEQ ID NO: 19)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_11	DLITLLSLFDGSDLITLLSLFD (SEQ ID NO: 20)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_12	DQYTLLLIYDGSQYTLLLIYD (SEQ ID NO: 21)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_13	ENGIVIVATEGSENGIVIVATE (SEQ ID NO: 22)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_14	EVIQHSTWLEGSEVIQHSTWLE (SEQ ID NO: 23)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_15	ELITLLSLFEGSELITLLSLFE (SEQ ID NO: 24)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_16	EQYTLLLIYEGSEQYTLLLIYE (SEQ ID NO: 25)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_17	PNGIVIVATPGSPNGIVIVATP (SEQ ID NO: 26)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_18	PVIQHSTWLPGSPVIQHSTWLP (SEQ ID NO: 27)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_19	PLITLLSLFPGSPLITLLSLFP (SEQ ID NO: 28)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM
p_20	PQYTLLLIYPGSPQYTLLLYP (SEQ ID NO: 29)	50 µM; 10 µM; 2,5 µM

La exploración inicial y la búsqueda de candidatos a interferidores de Als3 se basó en el ensayo de adhesión de *C.*

albicans SC5314 en placas de poliestireno de 96 pocillos tras la administración de todos los péptidos a tres concentraciones diferentes (250 μ M, 50 μ M y 10 μ M). Basándose en los resultados obtenidos con este ensayo de adhesión, también se probó el efecto de los péptidos en el desarrollo de biofilms maduros. La elección final de los candidatos a péptidos interferidores óptimos se basó en los resultados que mostraron una reducción en la adhesión y la formación de biofilms maduros causada por la menor concentración del péptido ensayada (10 μ M o 2,5 μ M). Un ejemplo de tres péptidos interferidores adecuados se muestra en la figura 5A y 5B.

Entre los 23 péptidos interferidores diferentes ensayados, el péptido F9 mostró la mejor actividad contra el desarrollo de biofilms maduros *in vitro*, incluso cuando se usaron concentraciones muy bajas ($p < 0,001$) (véase la figura 5). Basándose en los datos representados en la figura 5, el péptido F9 (RKLLFNLGSRNGIVIVATTR (SEQ ID NO: 9)) se seleccionó para experimentos adicionales. La principal secuencia agregadora del péptido F9 es NGIVIVATT (SEQ ID NO: 71) con un elevado potencial de agregación. Aparte del péptido F9, también el péptido E1 (RNGIVIVATTR (SEQ ID NO: 7)) manifestó una actividad significativa contra el desarrollo de biofilms maduros *in vitro*, cuando se usaron concentraciones mayores (250 μ M y 50 μ M).

1.3.1 Determinación de la concentración óptima del interferidor F9 en la adhesión y el desarrollo de biofilms

Los resultados iniciales (véase la figura 5) mostraron una actividad prometedora del péptido interferidor F9 contra biofilms de *C. albicans* maduros *in vitro* cuando se usa en las condiciones de exploración iniciales (250 μ M, 50 μ M, 10 μ M). En una etapa posterior, también se probaron concentraciones menores del péptido F9 (50 μ M, 10 μ M y 2,5 μ M). En primer lugar, se aclaró el efecto del péptido F9 durante el periodo de adhesión (90 min a 37 °C). Después, se probó su efecto en el desarrollo adicional de biofilms, cambiando el medio por RPMI1640-MOPS fresco, en ausencia de péptido durante 48 h. Ambos ensayos se efectuaron en placas de poliestireno de 96 pocillos y se cuantificaron mediante el ensayo de reducción XTT (véase la sección de materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura 6A y B.

Tal como se muestra en la figura 6A, incluso la concentración más baja (2,5 μ M) del péptido interferidor F9 redujo dramáticamente las propiedades de adhesión de células de *Candida* ($p < 0,001$). Y las concentraciones más altas de péptido interferidor F9 (50 μ M y 10 μ M) suprimieron prácticamente por completo la unión de *Candida*. *C. albicans als3 Δ als3 Δ* se usó como control. Sorprendentemente, se observó que la cepa con supresión génica de ALS3 seguía manifestando mejores propiedades de adherencia que las células de tipo silvestre tratadas con péptido interferidor F9. Sin limitarse a un posible mecanismo, una explicación posible puede ser que el péptido interferidor F9 causa beta-agregación no solo de Als3, sino también además de las proteínas homólogas Als1 y Als5 de *Candida albicans*.

Tal como se mostró anteriormente en la figura 5B, la administración continua de péptido F9 durante el periodo de desarrollo completo de biofilms de *C. albicans* (es decir, durante un periodo de 48 h), incluyendo la adhesión, dio como resultado una fuerte reducción de la formación de biofilms maduros. Mientras tanto, en este caso representado en la figura 6B, se demuestra que las células de *C. albicans* se trataron con péptido F9 solo durante el periodo de adhesión. Se dejó que se formasen biofilms maduros en RPMI1640-MOPS fresco sin péptido. De manera importante, el péptido interferidor F9 redujo la capacidad de las células de *Candida* para formar un biofilm de manera similar a la cepa de *C. albicans als3 Δ als3 Δ* . Las concentraciones mayores probadas (50 μ M), provocaron prácticamente un 90% de inhibición de biofilms, mientras que las concentraciones menores (10 μ M y 2,5 μ M), provocaron una reducción del biofilm del 40% al 50% ($p < 0,001$). Se llegó a la conclusión de que el péptido interferidor F9 era capaz de interferir de manera eficaz con dos condiciones experimentales de desarrollo de biofilms de *C. albicans*.

En una etapa posterior, también se investigó un potencial papel inhibidor del péptido interferidor F9 durante el desarrollo de biofilms de *C. albicans in vivo*. Se usó el modelo *in vivo* de biofilm subcutáneo de *C. albicans* en ratas (es decir, se formaron biofilms *in vivo* dentro de trozos de catéter de poliuretano de triple lumen) tal como se indica adicionalmente en la sección de materiales y métodos. Solo una concentración de péptido F9 (es decir, 50 μ M) se probó en las condiciones experimentales. El péptido se administró *ex vivo*, durante el acoplamiento inicial de *Candida* al sustrato (90 min, 37 °C). Después, se lavaron los catéteres y se implantaron por vía subcutánea en ratas. Los biofilms se estudiaron seis días después del implante y se cuantificaron mediante las UFC. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 7.

Las UFC medias \pm SD obtenidas por cada fragmento de catéter de catéteres tratados con péptido ($2,25 \pm 1,08 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter) fueron significativamente diferentes a la cantidad de células de *Candida* obtenidas de catéteres del control ($3,69 \pm 0,42 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter) ($p < 0,001$). De manera importante, cuatro catéteres tratados con péptido (20%) de los 20 contenían menos de $2,0 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter, que es el umbral para la determinación de infección por *Candida* en la práctica clínica (Mermel et al (2001) Clin. Infect. Dis. 32:1249-1272. *C. albicans als3 Δ als3 Δ* manifestó una capacidad de formación de biofilms similar ($3,30 \pm 0,55 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter) a las células de tipo silvestre no tratadas, pero *C. albicans als1 Δ als1 Δ als3 Δ als3 Δ* no lograron de manera significativa formar biofilms en el modelo de biofilm subcutáneo *in vivo*, tal como se evidenció por los bajos valores de UFC ($1,46 \pm 1,24 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter) ($p < 0,001$). La potente actividad del péptido F9 podría provenir del efecto del péptido durante el periodo de adhesión. Por lo tanto, también se probó la actividad del péptido F9 durante la adhesión de *C. albicans* sobre sustrato de poliuretano (figura 8).

El tratamiento de células de *Candida* con péptido F9 redujo significativamente la unión a dispositivos de poliuretano ($2,18 \pm 0,12 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter) en comparación con el control ($3,06 \pm 0,39 \log_{10}$ UFC/fragmento de catéter) ($p < 0,001$). Estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos durante la evaluación de las propiedades de adhesión de *Candida* sobre poliestireno. Esto sugiere que la agregación de proteína de Als3 apareció durante las etapas tempranas del desarrollo del biofilm. Tal como se esperaba, *C. albicans als3Δ/als3Δ* y *C. albicans als1Δ/als1Δ als3Δ/als3Δ* mostraron capacidades de adherencia significativamente menores sobre poliuretano que la cepa de tipo silvestre ($p < 0,001$).

10 1.3.2 Especificidad del interferidor F9 por *Candida albicans*

Se investigó la especificidad del péptido interferidor F9 por *C. albicans* en comparación con una *Candida* spp. distante, es decir, *Candida glabrata* ATCC2001, para la inhibición de la formación de biofilms *in vitro*. La secuencia de beta agregación del péptido F9 (NGIVIVATT (SEQ ID NO: 71)) no está presente en *C. glabrata* - la secuencia más estrechamente relacionada en *C. glabrata* es NGVVIVAAT (SEQ ID NO: 73). Se demostró que *Candida glabrata* forma un biofilm eficaz *in vitro* sobre poliestireno y poliuretano. Se probó el efecto de F9 contra la adhesión y formación de biofilms de *C. glabrata* en placas de poliestireno de 96 pocillos *in vitro*. Los biofilms se cuantificaron mediante el ensayo de reducción XTT y los resultados indicaron que el péptido F9 no interfirió con la adhesión y el desarrollo de biofilms de *C. glabrata*. Estos datos apoyan el hecho de que la eficacia del péptido F9 contra la adhesión y el desarrollo de biofilms maduros es dependiente de la secuencia y altamente específica.

15 1.3.3 Aplicación del péptido interferidor F9 también reduce la capacidad de *C. albicans* para adherirse e invadir células epiteliales

25 Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, Als3 de *C. albicans* también desempeña un papel en la adherencia e invasión a células epiteliales y endoteliales. Se demostró (en el ejemplo 1.2.2) que las cepas recombinantes que expresan un interferidor específico de Als3 redujo significativamente la capacidad para adherirse e invadir a líneas celulares epiteliales en condiciones inducidas por el interferidor. En este caso, se investigó el efecto de la aplicación externa del péptido interferidor F9 en la adherencia e invasión a células epiteliales de *C. albicans* SC5314. Para esto, se incubaron las células de *Candida* junto con las células humanas (línea celular epitelial TR-146) en presencia del péptido F9 durante la adhesión (1 h) o la invasión (3 h). Se determinó la cantidad de células adheridas e internalizadas mediante recuento usando epifluorescencia. Los resultados se presentan en la figura 9.

35 Tal como se esperaba, *C. albicans als3Δals3Δ* mostró una capacidad significativamente reducida (60%) para adherirse y para invadir células epiteliales ($p < 0,001$). Se observó que el efecto del péptido F9 en la adherencia y la invasión de *C. albicans* SC5314 era dependiente de la concentración (figura 9). La mayor concentración (50 μ M) redujo la adhesión de *Candida* en un 40% en comparación con el control (sin péptido). Las concentraciones menores (10 μ M y 2,5 μ M) provocaron un efecto de aproximadamente el 20% - 15%, respectivamente. Aparte de la adhesión, también se determinó el efecto del péptido F9 en la invasión. Las concentraciones mayores (50 μ M) del péptido F9 redujo la invasión en un 34%, mientras que las concentraciones intermedias (10 μ M) redujeron la invasión en un 15%. La concentración más baja (2,5 μ M) no tuvo efecto sobre la invasión (100%). Aunque la adhesión se vio claramente afectada por la adición de F9, el efecto en la invasión fue menos evidente. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, se sabe que la invasión puede producirse mediante mecanismos diferentes y adicionales, de los cuales, algunos pueden ser menos dependientes de Als3.

40 1.3.4 Especificidad del péptido interferidor F9 por Als3

50 En lo que se ha descrito anteriormente se ha demostrado que el péptido F9 causa un efecto significativo en la adhesión de *C. albicans* a biomateriales (discos cuadrados de silicona, poliestireno y poliuretano), también durante la formación de biofilms *in vitro* e *in vivo* y también en la adhesión y la invasión a células epiteliales. Sin embargo, estos resultados apuntan al hecho de que Als3 se usa como diana, queda por demostrar si Als3 es una diana específica o no. Para demostrar la especificidad, se decidió detectar la presencia de Als3 en la superficie de células de *C. albicans* tras la administración del péptido F9 mediante microscopía de fluorescencia en competición con anticuerpos específicos de Als3 disponibles. Als3 se expresa principalmente en células hifales y por lo tanto, se indujo en primer lugar la formación de hifas durante 20 min. Diferentes concentraciones de péptido F9 (50 μ M, 10 μ M y 2,5 μ M) se administraron a las células hifales durante 45 min. Posteriormente, se lavaron las células y se incubaron en presencia de antisuero para ALS3 durante 60 min a 30 °C y se contratiñó con anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488. Las células de *Candida* tratadas con DMSO al 1% se usaron como control. Las células teñidas se visualizaron con epifluorescencia usando un filtro ajustado para detectar Alexa Fluor 488. Se observó que las células de *Candida* tratadas con el péptido interferidor eran capaces de competir de manera eficaz con la unión del anticuerpo anti-ALS3 de una manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, las células de *Candida* tratadas con la concentración más elevada (50 μ M) de péptido F9 demostró una reducción de aproximadamente el 50 % en la unión al antisuero de ALS3 en comparación con el control (sin péptido, solo se añadió DMSO al 1%). Además, las concentraciones intermedias (10 μ M) también redujeron la capacidad de las células de *Candida* para unirse al anticuerpo para Als3. Estos datos también se cuantificaron determinando la capacidad de las células de *C. albicans*

SC5314 tratadas con péptido interferidor para unirse al anticuerpo anti-ALS3 en una estrategia de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En comparación con la microscopía de fluorescencia, este método permitió detectar la señal de fluorescencia a partir de tan solo 10 000 células de *Candida*. Los datos de FACS soportaron claramente la observación obtenida a partir de imágenes de microscopía. Las células hifales de *C. albicans* tratadas con péptido F9 (50 µM), presentaron una cantidad significativamente reducida de señal fluorescente (54%) en comparación con el control ($p < 0,001$). Además, la concentración intermedia (10 µM) también causó una reducción sorprendente en la unión al antisuero de ALS3 (45%), mientras que la concentración más baja (2,5 µM) también provocó una reducción del 10%. Por lo tanto, los datos demuestran que el péptido F9 se dirige específicamente a Als3 e induce su agregación, lo que da como resultado una cantidad significativamente reducida de Als3 en las células hifales, lo que se caracterizó por una unión reducida al anticuerpo anti-ALS3 en una manera dependiente de la concentración de F9.

1.4 Los dispositivos médicos recubiertos con interferidor impiden la formación de biofilms de *C. albicans*

Normalmente se diagnostica *Candida albicans* en catéteres recubiertos de biofilm. *Candida sp.* puede formar biofilms en una gran variedad de dispositivos médicos de catéteres urinarios y vasculares, en prótesis dentales, de cadera, de rodilla y de voz e incluso de marcapasos. Esta gran cantidad de biomateriales implantados que pueden infectarse por *Candida* se refleja en la capacidad para adherirse a muchos tipos de sustrato, incluyendo materiales de plástico, tales como silicona, poliestireno y poliuretano. La infección de estos dispositivos médicos con frecuencia ocasiona la pérdida de su función y pueden constituir una fuente de infección sistémica. La que los biofilms de *C. albicans* son normalmente extremadamente resistentes a la terapia antifúngica común, con frecuencia es necesario retirar los dispositivos infectados. Los mecanismos de resistencia no están bien establecidos pero la limitación de acceso del fármaco a las células fúngicas es una explicación posible. En los ejemplos anteriores se demostró que una estrategia alternativa es interferir con la adhesión de *C. albicans* al sustrato (por ejemplo, silicona (ejemplo 1.2.1), poliestireno (ejemplo 1.3.2) y poliuretano (ejemplo 1.3.2), es decir, para prevenir la formación del biofilm en lugar de combatir un biofilm maduro. En la estrategia actual, se preparó un material de catéteres que está recubierto covalentemente con el interferidor peptídico F9. Los métodos para unir covalentemente los péptidos a un soporte sólido se han descrito en la técnica. El rendimiento de estos catéteres acoplados al interferidor se evaluaron en un modelo de rata *in vivo*, tal como se describe en el ejemplo 1.3.2 de acuerdo con la sección de materiales y métodos 1.6.7.2.

1.5 Regulación a la baja de calcineurina usando moléculas transgénicas

En *Candida albicans*, Hsp90 es una chaperona esencial altamente conservada implicada en la patogenicidad y en la resistencia a antifúngicos. La fosfatasa específica de serina/treonina, calcineurina (CNB1) es una diana de Hsp90 y un mutante de eliminación homocigoto para *cnb1* es sensible al estrés. Por lo tanto, se decidió usar como diana la proteína calcineurina usando las moléculas presentadas en el presente documento.

Diseño de moléculas inductoras de la agregación de *Cnb1*

El análisis TANGO de la subunidad reguladora de calcineurina reveló dos regiones propensas a la agregación. Las secuencias de proteína predichas FAFNIY (SEQ ID NO: 104) y LFIVM (SEQ ID NO: 105) mostraron una propensión a la β -agregación del 40% y el 96%, respectivamente. Estas dos secuencias cortas se usaron para diseñar varias construcciones diferentes para regular a la baja CNB1 usando una estrategia transgénica. Las construcciones tenían la siguiente estructura:

Promotor - yEGFP - marcador de HA (secuencia YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 108)) - enlazador de aminoácidos (secuencia MAQW (SEQ ID NO: 109)) - molécula con la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, con $n=5$ y

$X_1 = QN$
 $Y_1 = STLIVL$ (SEQ ID NO: 110)

$X_2 = Q$

$Z_1 = 0$

$X_3 = N$

$Y_2 = STVIF$ (SEQ ID NO: 111)

$X_4 = E$

$Z_2 = Q$

$X_5 = N$

$Y_3 = STVIF$ (SEQ ID NO: 111)

$X_6 = EQN$

$Z_3 = KPAGAAKPGAAG$ (SEQ ID NO: 112)

$X_7, Y_4, X_8, Z_4, X_9, Y_5, X_{10}$ se varían de acuerdo a lo que se muestra en la tabla 2; y Z_5 es nada.

Tabla 2. Estructura de las construcciones usadas para regular a la baja la calcineurina.

Construcción	X_7	Y_4	X_8	Z_4	X_9	Y_5	X_{10}
n.º 1	R	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	R	GS	R	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	R

Construcción	X ₇	Y ₄	X ₈	Z ₄	X ₉	Y ₅	X ₁₀
n.º 2	R	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	D	GS	E	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	R
n.º 3	R	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	D	PPP	E	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	R
n.º 4	R	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	R	PPP	R	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	R

Escrita de manera contigua, la secuencia codificada por la construcción número 1 tiene el siguiente aspecto:
 Promotor - yEGFP - YPYDVDPDYA MAQW QNSTLIVLQNSTVIFEQNSTVIFEQNKPAGAAKPGAAGRFAFNIYRG-SRLFIVMR (SEQ ID NO: 113)

Las moléculas usadas en estas construcciones contienen esencialmente dos tipos de regiones inductoras de la agregación: Y₁, Y₂ e Y₃ sirven como secuencias sintéticas (es decir, de origen no natural en *Candida*/no parte de CNB1) que refuerzan la agregación, mientras que Y₄ e Y₅ son las dos regiones propensas a la agregación identificadas en la proteína CNB1 que aseguran la especificidad.

Propiedades de transformantes

La caracterización inicial de los transformantes que portan estas construcciones se efectuó mediante pruebas in vivo para la resistencia a diversos tipos de estrés (a los que son sensibles los mutantes *cnb1Δ*). Las construcciones se colocaron bajo el control de un promotor PCK1 que está reprimido en medio que contiene glucosa (medio de dextrosa sintético (SD)) y se indujo en condiciones gluconeogénicas (medio de casaminoácidos sintéticos (SCAA)). Tal como se muestra en la FIG. 10, los transformantes son de hecho más sensibles a la presencia de SDS en el medio y esto solo para cuando se induce la proteína agregadora. No se observa efecto en el crecimiento cuando no hay presente estrés, lo que indica que el fenotipo observado no se debe a efectos específicos o tóxicos relacionados con la expresión de las construcciones.

Los cuatro transformantes diferentes difieren y solo difieren, en la naturaleza (y carga) de los restos constitutivos X₈ y X₉ y el enlazador Z₄. Sin embargo, todos comparten el mismo fenotipo típico para la regulación a la baja de calcineurina. Por lo tanto, en esta situación experimental, la carga de los restos constitutivos y la naturaleza del enlazador tiene únicamente una importancia secundaria - el sistema es lo suficientemente robusto como para lograr la regulación a la baja de la proteína diana, independientemente de estas variantes.

Ya que las cuatro construcciones comparten las mismas regiones inductoras de la agregación CNB1 en el mismo orden (es decir, FAFNIY (SEQ ID NO: 104) y LFIVM (SEQ ID NO: 105)), que también es el mismo orden de N a C-terminal, estas regiones se producen en la proteína de calcineurina, se decidió probar si el orden de estas regiones determinantes de la agregación podría ser importante.

Esto se ha evaluado creando construcciones donde solo se intercambian las regiones Y₄ e Y₅, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Estructura de las construcciones usadas para regular a la baja la calcineurina, con regiones agregantes intercambiadas.

Construcción	X ₇	Y ₄	X ₈	Z ₄	X ₉	Y ₅	X ₁₀
n.º 5	R	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	R	GS	R	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	R
n.º 6	R	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	D	GS	E	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	R
n.º 7	R	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	D	PPP	E	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	R
n.º 8	R	LFIVM (SEQ ID NO: 105)	R	PPP	R	FAFNIY (SEQ ID NO: 104)	R

También se probaron los transformantes 5 a 8 respecto de su sensibilidad a SDS usando el mismo ensayo. Todos los transformantes se comportaron de manera similar a aquellos con las construcciones 1 a 4, es decir, el fenotipo se asemeja al de levaduras de tipo silvestre en condiciones represoras del promotor y se asemeja al mutante de eliminación *cnb1* homocigoto en condiciones inductoras del promotor. Esto permite concluir que, al menos en esta situación experimental, el orden de las regiones inductoras de la agregación no es vital para lograr la regulación a la baja específica y no necesita ser idéntico al orden en el que las regiones aparecen en la proteína diana.

Para comprobar si ambas regiones contribuyen a la agregación específica, las construcciones donde Y₄ e Y₅ son idénticas (y por lo tanto, corresponden a LFIVM (SEQ ID NO: 105) o FAFNIY (SEQ ID NO: 104)) también se evaluaron. Estos transformantes mostraron el mismo fenotipo (es decir, la presencia de cualquiera de las regiones sola es suficiente para lograr la regulación a la baja de la calcineurina), pero en menor medida (es decir, no se observó el fenotipo en todos los transformantes ensayados, posiblemente debido a los mayores niveles de umbral de expresión necesarios para inducir la agregación específica). Por consiguiente, puede ser beneficiosa la combinación de dos regiones inductoras de la agregación en la misma proteína para dirigirse a la proteína.

1.6 Materiales y métodos para las aplicaciones antifúngicas

1.6.1. Animales e inmunosupresión

5 Los animales usados para los experimentos *in vivo* fueron ratas Sprague Dawley libres de patógenos específicos de 200g (Janvier, Francia). Se administró a todos los animales dieta convencional a voluntad y se les inmunosuprimió con 1mg/l de dexametasona (Organon, Países Bajos) en el agua de bebida hasta 24 horas antes y durante todo el procedimiento experimental. Se añadió tetraciclina (1g/l) o ampicilina (0,5g/l) al agua para minimizar las infecciones bacterianas. Todos los experimentos animales se efectuaron de acuerdo con los reglamentos europeos referentes a la protección y al bienestar de los animales de laboratorio y fueron aprobados por el comité de ética animal de la Katholieke Universiteit Leuven.

1.6.2. Agentes terapéuticos a base de péptidos con alta propensión a agregar la proteína de interés - Als3

15 Los agentes terapéuticos a base de péptidos específicos para *C. albicans* con alta propensión a causar beta-agregación cruzada de Als3p se sintetizaron por JPT Peptide Technologies GmbH (Berlín, Alemania). Los péptidos altamente purificados (>90%, pureza detectada por HPLC) se suministraron en forma liofilizada y se mantuvieron a -20 °C antes de su uso. Se prepararon soluciones madre de cada péptido en DMSO al 50% en agua ultrapura (Invitrogen) a una concentración final de 10 mM - 20 mM. Tres concentraciones diferentes (50 µM, 10 µM y 2,5 µM) del péptido F9 positivo se probaron en cada ensayo. Los experimentos que incluían péptidos se llevaron a cabo en material de plástico de baja adhesión (Bioplastics, Países Bajos) para reducir la auto-agregación.

1.6.3. Condiciones de cultivo de levaduras

25 En general, las células de levadura se cultivaron durante una noche en agitación continua a 30 °C en medio YP rico que contenía un 1% (p/v) de extracto de levadura, un 2% (p/v) de Bactopeptona y un 2% (p/v) de D-glucosa (YPD) a menos que se indique lo contrario. Antes de los experimentos de biofilms *in vitro* e *in vivo* de *C. albicans*, las células se cultivaron sobre medio YPD sólido (que contenía un 1,5% (p/v) de agar) durante una noche a 37 °C. Las cepas que portaban las construcciones de agregador se cultivaron en Levadura Nitrógeno Base (YNB, por sus siglas en inglés) con aminoácidos y sulfato de amonio, pH 6,5, (Difco, EE. UU.) complementado con succinato, cisaminoácidos (condiciones inductoras del promotor) o complementado con un 4% de D-glucosa (condiciones represoras del promotor). Para estudiar el efecto potencial de los péptidos agregadores en el crecimiento fúngico, las células se incubaron en presencia de una concentración 50 µM de cada péptido a 30 °C. La concentración final de DMSO en la muestra de control no superó el 1%. Se recogieron muestras cada hora y se midió la densidad celular usando un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) a 600 nm.

1.6.4. Transición de levadura a hifa

40 Se cultivaron células de *Candida* durante una noche en medio YPD, se lavaron dos veces y se incubaron adicionalmente en agua estéril durante 2 h adicionales a 30 °C (periodo de privación). A continuación, se ajustó la concentración de células hasta 1×10^6 células/ml y las células se incubaron en medio YP que contenía un 10% de suero fetal bovino (FBS) (F7524, Sigma, EE. UU.) o en RPMI1640-MOPS, pH 7,0 con/sin péptidos (50 µM). Los cultivos se incubaron durante 1,5 h - 2 h a 37 °C. Se determinó la proporción de hifas auténticas frente a levaduras en gemación mediante microscopía óptica (Axiostar plus, Carl Zeiss, Alemania) a una ampliación de 40x.

1.6.5. Determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM)

50 Se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) de células planctónicas para antifúngicos de acuerdo con NCCLS M27-A3 (2008). Brevemente, se cultivaron cepas de *C. albicans* durante una noche a 30 °C en una placa de YPD. La suspensión de células de *Candida* ($1-5 \times 10^6$ células/ml) se preparó en medio RPMI1640-MOPS. Las células se diluyeron adicionalmente a 1:50 y a partir de dicha suspensión, se aplicaron 100 µl de células de *Candida* a cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron 100 µl, que contenían diferentes concentraciones de antifúngicos a ensayar. Los pocillos de control incluyeron células de *Candida* en los casos donde solo se añadió RPMI1640-MOPS. Se dejó crecer las células durante dos días y se determinó la eficacia de los antifúngicos midiendo la densidad óptica (DO) de las células usando un espectrofotómetro (Spectra max Plus 384) a 490 nm. Los datos se determinaron como CIM₅₀ y CIM₉₅, que representa la concentración inhibidora mínima del fármaco que inhibe el crecimiento fúngico en un 50% o 95%, respectivamente.

1.6.6. Determinación de la actividad fungicida mínima (CFM)

60 Se determinó la actividad fungicida mínima (MFC) tal como se describe por Canton et al (2009) Antimicrob Agents Chemother. Jul;53(7):3108-11. La CFM se determinó solo para anidulafungina, ya que este es el único fármaco con actividad fungicida en nuestro estudio. Brevemente, se sembraron 100 µl de suspensión celular de *Candida* pretratada con diferentes concentraciones de fármaco antifúngico en placas de YPD y se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 24 h. La CFM se determinó como resultado de una inhibición del crecimiento del 99%.

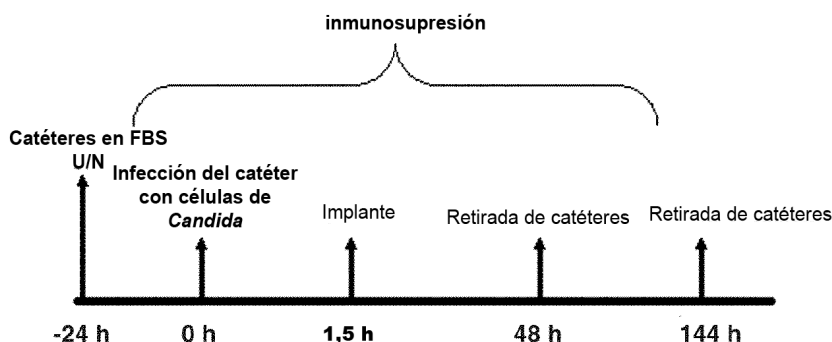
1.6.7. Modelos de biofilm de *C. albicans*

1.6.7.1 Sistema de biofilm de *C. albicans in vitro*

- 5 Se estudiaron biofilms de *C. albicans in vitro* en tres tipos diferentes de biomateriales, a saber, placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Alemania), silicona (CS Hyde, EE. UU.) y catéteres intravenosos de poliuretano de triple lumen (diámetro de 2,4mm) (Arrow International Reading, EE. UU.). Antes de iniciar el biofilm, la silicona se cortó en pequeños trozos cuadrados (1cm x 1cm) y el poliuretano en trozos de 1 cm.
- 10 Se incubaron dispositivos de silicona o poliuretano en FBS al 99% (F7524, Sigma) durante una noche a 37 °C. Las células se lavaron y se resuspendieron en suero salino tamponado con fosfato (PBS) 1x, pH 7,4. Se preparó una suspensión de *Candida* de 1×10^7 células/ml o 5×10^4 células/ml en medio RPMI1640-MOPS, succinato, pH 6,5 o en medio YNB, D-glucosa al 4%. En total, se añadió 1 ml de la suspensión celular a los discos de silicona o catéteres de poliuretano colocados en una placa de 24 pocillos y se inocularon 100 μ l de suspensión celular en una
- 15 placa de poliestireno de 96 pocillos. La unión de las células a un sustrato se logró por incubación a 37 °C, durante 90 min en condiciones estáticas (periodo de adhesión). Después, se retiraron las células de *Candida* no unidas mediante dos rondas de etapas de lavado con 1 x PBS y se sumergieron en medio fresco durante 48 h a 144 h a 37 °C (biofilm maduro). Después de ello, los biofilms se lavaron dos veces con 1 x PBS y se cuantificaron.

20 1.6.7.2 Sistema de biofilm de *C. albicans* subcutáneo *in vivo*

La línea temporal experimental del desarrollo de biofilms de *C. albicans in vivo* en un nuevo modelo subcutáneo se ilustra en el esquema 1.



25 Esquema 1: Línea temporal experimental del modelo de biofilm de *Candida albicans*. Línea temporal experimental del desarrollo de biofilms de *C. albicans in vivo* en un nuevo modelo subcutáneo.

- 30 Se cultivaron células de *C. albicans* durante una noche a 37 °C en placas YPD, se lavaron y se resuspendieron en 1 x PBS. La suspensión de células de *Candida* (5×10^4 células/ml) se preparó en medio RPMI1640-MOPS mediante conteo. Se incubaron catéteres intravenosos de triple lumen de poliuretano (2,4 mm de diámetro) cortados en segmentos de 1 cm (Arrow International in FBS a 37 °C. Los catéteres recubiertos de suero se incubaron durante 90 min a 37 °C en 1 ml de suspensión celular de *Candida* (periodo de adhesión). Después del periodo de adhesión, los
- 35 catéteres se lavaron dos veces con 1 x PBS antes de implantarse bajo la piel de ratas, tal como se ha descrito (Van Wijngaerden et al. (1999) J Antimicrob Chemoth 44:669-674). La anestesia se llevó a cabo mediante una inhalación corta de gas de eflurano (Alyrane™, Pharmacia). Se mantuvo dormidas a las ratas durante el procedimiento de implante mediante una mezcla gaseosa de eflurano (20 %) y oxígeno (80 %). Se rasuró la parte baja del lomo de la rata y se desinfectó con clorhexidina al 0,5 % en alcohol al 70 %. Se practicó una incisión de 10 mm
- 40 longitudinalmente y se diseccionó cuidadosamente la subcutis para crear 3 túneles subcutáneos. Se implantaron hasta diez fragmentos de catéter. La incisión se cerró con grapas quirúrgicas (Precise™, EE. UU.) y se desinfectó con clorhexidina al 0,5% en alcohol al 70%. Los biofilms se formaron durante 48 h y 144 h. Para el explante del catéter, se sacrificó a las ratas mediante inhalación de CO₂. Se desinfectó la piel y se retiraron los fragmentos de catéter de debajo del tejido subcutáneo, se lavaron dos veces con PBS 1 x y se cuantificaron o visualizaron. Se
- 45 caracterizó el efecto de los péptidos que promueven la agregación de Als3p durante el desarrollo de biofilms de *Candida in vivo*, también. Se incubaron fragmentos de poliuretano recubiertos con suero con células de *Candida* (5×10^4 células/ml) en presencia de una concentración 50 μ M de péptido F9 positivo y péptido F9_negativo, p13 y p20 durante el periodo de adhesión (90 min, 37 °C). Después, las células no adheridas se retiraron mediante dos rondas de etapas de lavado. Los catéteres se implantaron por vía subcutánea en el lado trasero de ratas inmunosuprimidas
- 50 como se ha descrito anteriormente. Los biofilms se estudiaron tras seis días después del implante mediante conteo de UFC.

1.6.8. Métodos de cuantificación de biofilms

55 1.6.8.1 Ensayo de reducción de XTT

Se estudió la actividad metabólica de células de *Candida* en biofilms *in vitro* usando el ensayo de reducción de XTT. Este método se basa en el cambio colorimétrico de un sustrato específico - XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (Sigma, EE. UU.) que se reduce a XTT formazano por las deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicas activas, medido mediante un espectrofotómetro a 490 nm. La solución de trabajo de XTT (Sigma, EE. UU.) se preparó en 1 x PBS estéril con la concentración final de 1 mg/ml. Antes de su uso, se añadió menadiona a la solución de XTT a una concentración final de 1 μ M. La solución se agitó vorticialmente y se aplicaron 100 μ l en cada pocillo que contenía biofilm y se incubó durante 3-5 h a 37 °C en la oscuridad. La intensidad del cambio colorimétrico se midió mediante un espectrofotómetro (Spectra max Plus 384) a 490 nm. Como blanco, se usó la solución de XTT-menadiona sin células de *Candida*.

1.6.8.2 Cuantificación de la biomasa de biofilms fúngicos

La cantidad de biomasa de biofilm fúngico formado dentro del lumen del catéter de catéteres explantados *in vitro* e *in vivo* se determinó mediante las unidades formadoras de colonias (UFC). Brevemente, se sometieron a ultrasonidos sustratos *in vitro* y catéteres de biofilms *in vivo* durante 10min a 40000Hz en un sonicador de baño de agua (Branson 2210) y además se agitaron vorticialmente durante 30s en 1 x PBS. Las muestras originales y una dilución 1:10 se sembraron en placas de YPD siempre por duplicado. Las UFC se contaron después de dos días a 37 °C.

1.6.9. Visualización de biofilms de *Candida* por microscopía

1.6.9.1 Microscopía de fluorescencia

Antes de la microscopía de fluorescencia, se cortaron longitudinalmente los catéteres *in vitro* e *in vivo* con biofilms unidos y se incubaron en tampón 1 x PBS con 50 μ g/ml de blanco de calcoflúor (Sigma, EE. UU.) durante 20 min. Estos dispositivos se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2. Las imágenes se grabaron mediante una cámara Zeiss Axiocam HRm usando el programa informático Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

1.6.9.2 Microscopía de barrido de electrones

Los catéteres (cortados longitudinalmente) se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón de calcodilato de sodio 0,1 M (pH 7,4) antes de la microscopía. Los catéteres se retiraron de la solución de fijación y se secaron durante una noche. Las muestras mostradas se recubrieron con una lámina de oro y se vieron en un microscopio electrónico de barrido XL30 ESEM FEG (Philips).

1.6.9.3 Microscopía láser confocal de barrido

Los catéteres cortados longitudinalmente y fijados se incubaron con 50 μ g/ml concanavalina A durante una hora a 37 °C (concanavalina A, conjugado con Alexa Fluor®488, Invitrogen). Las imágenes confocales se adquirieron y analizaron con un sistema LSM510/ConfoCor2 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). El láser de argón (6 A, filtro sintonizable acousto-óptico ajustado al 50%) proporcionó la luz de excitación de 488 nm (para la fluorescencia de Concanavalina-Alexa488). La luz de excitación se reflejó por un espejo dicróico (HFT 488) y se enfocó a través de un objetivo Plan-NeoFluar 20x NA0.5. La luz de emisión de fluorescencia pasó a través de un filtro de pase largo de 505-nm y una unidad de agujeros de alfiler 1-Airy. Antes, se evaluó el espesor del biofilm, en primer lugar, se tomaron las imágenes en 3 dimensiones (3-D) de los biofilms maduros. Se efectuaron aproximadamente 200 secciones por toda la arquitectura del biofilm. Después, se estimó el espesor del biofilm a partir de los bordes externos del área donde la señal de fluorescencia gana intensidad por encima de la mitad de su máximo, hasta que se determinó el área donde ya no puede detectarse la señal fluorescente.

1.6.10. Microscopía de fluorescencia de proteína fluorescente verde (GFP)

Se usaron células sin fijar directamente y se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2. La GFP se visualizó con una fuente de luz UV y un filtro de GFP de pase largo. Las imágenes se tomaron mediante la cámara acoplada al dispositivo Quantix charge usando el programa informático Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

1.6.11. Absorción del antisuero para ALS3 de conejo con tubos germinales de *C. albicans als3 Δ als3 Δ*

Se reconstituyó la forma liofilizada del anticuerpo para ALS3 en 500 μ l de agua estéril. El anticuerpo se absorbió con tubos germinales de *C. albicans als3 Δ als3 Δ* antes de usarlos para microscopía de fluorescencia y FACS. Se germinaron tres matraces que contenían 1 x 10⁶ células/ml en medio RPMI1640 con L-glutamina y con HEPES (PAA, Austria) durante 90 min a 37 °C. Los tubos germinales se dividieron en tubos de micro-centrifugación, mezclados con antisuero para ALS3 y se incubaron durante 1 h sobre hielo con agitación suave. Después, se centrifugaron las células y se transfirió el sobrenadante a otro matraz que contenía tubos de *C. albicans als3 Δ als3 Δ germ* frescos. Este procedimiento se repitió tres veces en total. El antisuero para ALS3 se separó en alícuotas en un volumen menor (20 μ l) y se almacenó a -80 °C. La especificidad del anticuerpo se confirmó

mediante microscopía de fluorescencia (Leica DFC350 FX, Mannheim, Alemania).

1.6.12. Crecimiento y diferenciación de células epiteliales

5 Originariamente, se obtuvo la línea celular TR-146 de células epiteliales procedentes de la mucosa bucal de carcinoma escamoso de Cancer Research Technology, Londres. Las células TR-146 son capaces de formar capas
 10 estratificadas de células que muestran muchas similitudes en comparación con la mucosa bucal humana normal (Rupniak et al., (1985) J Natl Cancer Inst 75:621-35. Las células TR-146 se cultivaron de manera rutinaria (pases 4 - 20) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía NaHCO₃, D-glucosa, piruvato de sodio y glutamina estable con suero de ternero fetal (FCS) al 10% (Sigma, EE. UU.), sin antibióticos o agentes antifúngicos. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C en CO₂ al 5%. Para los experimentos de adherencia e invasión, se sembraron 1 x 10⁵ células TR-146 en portaobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro colocados previamente en placas de 24 pocillos.

15 1.6.13. Ensayo de adherencia

Se cultivaron cepas de *C. albicans* en YPD líquido, succinato, pH 6,5 o YNB (D-glucosa al 4%) a 30 °C en un incubador con agitación durante una noche. Las células de *Candida* se lavaron tres veces con 1 x PBS y se
 20 determinaron hasta una concentración final de 1 x 10⁵ células/ml en DMEM que contenía NaHCO₃, D-glucosa, piruvato de sodio y glutamina estable sin FCS. Las células TR-146 se cultivaron sobre portaobjetos de vidrio de 12 mm y se inocularon con células de *Candida*. Se probaron diferentes concentraciones de péptido F9 positivo (50 µM, 10 µM y 2,5 µM) y péptidos negativos F9_negat, 13 y 20 (50 µM) sobre la adhesión de *Candida* a células epiteliales. Los ensayos de adhesión se efectuaron durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5%. Después de la adhesión, se lavaron las
 25 células tres veces con 1 x PBS para eliminar células no adherentes y después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Después de un enjuagado exhaustivo con 1 x PBS, se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,5% en agua durante 5 min y posteriormente se tiñeron con blanco de calcoflúor (dilución 1:100) durante 15 min y de lavaron adicionalmente con agua, tres veces durante 10 min, a 30 °C, 180 rpm. Los portaobjetos se montaron en posición invertida sobre un portaobjetos de microscopio y se cuantificaron con epifluorescencia usando un conjunto de filtro para detectar el blanco de calcoflúor (filtro para DAPI) (Leica DFC350
 30 FX, Mannheim, Alemania). Se calculó el porcentaje de células adheridas como la media de células de *Candida* unidas sobre cien áreas dispersas a lo largo de toda la superficie del cubreobjetos.

1.6.14. Ensayo de invasión

35 Se infectaron las monocapas de líneas celulares TR-146 con células de *Candida* como se ha descrito anteriormente en 6.2.15. Después de un periodo de incubación de 3 h de las monocapas con células de *Candida* a 37 °C, CO₂ al 5%, se aspiró el medio por encima de las células epiteliales y se enjuagaron tres veces las monocapas con 1 x PBS para eliminar las células fúngicas que no se habían asociado a células epiteliales. A continuación, se fijaron las
 40 células epiteliales con Histofix al 4% (Roth) durante 20 min a 37 °C. Todas las células fúngicas que permanecían adherentes a la superficie se tiñeron durante 1 h con un anticuerpo policlonal de conejo anti-*C. albicans* (Acris Antibodies, Alemania) (dilución 1:2000) y se contratiñeron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (dilución 1:5000). Después de un enjuagado exhaustivo con 1 x PBS, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% en agua durante 5 min. Además, las partes adherentes e invasoras de células fúngicas en las células epiteliales se tiñeron con blanco de calcoflúor (dilución 1:100) durante
 45 15 min y se lavaron tres veces con agua, durante 10 min a 30 °C, 180 rpm. Los portaobjetos se montaron en posición invertida sobre portaobjetos de vidrio y las células teñidas se visualizaron con epifluorescencia usando un filtro ajustado para detectar el blanco de calcoflúor (filtro para DAPI) y Alexa Fluor 488 (Leica DFC350 FX, Mannheim, Alemania). Se determinó el porcentaje de células de *C. albicans* invasoras dividiendo el número de células internalizadas entre el número total de células adherentes. Se contaron al menos 100 células fúngicas sobre
 50 cada portaobjetos.

1.6.15. Detección de la unión del anticuerpo para ALS3 a *C. albicans* mediante microscopía de fluorescencia y mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)

55 Se recogieron cultivos de una noche de células de *C. albicans* y se lavaron tres veces con 1 x PBS. Se prepararon células de *Candida* (2,5 x 10⁶ células/ml) en medio RPM 11640 con L-glutamina y con HEPES (PAA, Austria) con/sin péptido F9 (50 µM, 10 µM y 2,5 µM) o los péptidos negativos F9_negat, 13 y 20 (50 µM). Se llevó a cabo la adhesión y la inducción de hifas de *Candida* sobre portaobjetos de vidrio de 12 mm o placas de Petri de vidrio (Ø 5 cm) durante 45, 60 o 90 min a 37 °C, CO₂ al 5%. Las células no adheridas se lavaron con 1 x PBS y se fijaron
 60 inmediatamente con Histofix al 4% (Roth) durante 20 min a 37 °C. Después de un enjuagado exhaustivo con 1 x PBS, se permeabilizaron las células en Triton X-100 al 0,5% durante 5 min, se lavaron y se incubaron en albúmina sérica bovina (BSA) al 1% durante 20 min a TA. Además, las células adheridas se incubaron en presencia de antisuero para ALS3 (dilución 1:500) durante 60 min a 30 °C y se contratiñeron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (dilución 1:2000). Después de la etapa final de lavado,
 65 se montaron los portaobjetos en posición invertida sobre portaobjetos de vidrio y las células teñidas se visualizaron con epifluorescencia usando un filtro ajustado para detectar el Alexa Fluor 488 (Leica DFC350 FX, Mannheim,

Alemania). Finalmente, se desprendieron las células de los portaobjetos usando un rascador de células y se resuspendieron en 0,5 ml de 1 x PBS. La intensidad de fluorescencia de las hifas se midió usando un citómetro de flujo LSRII (Becton Dickinson, <http://www.bd.com>). Se recogieron datos de fluorescencia para 10.000 células de cada cepa.

5

1.6.16. Aislamiento de esferoplastos y tinción de Coomassie de geles de poliacrilamida

Se incubaron células de *Candida* (1×10^7 células/ml) en medio YPD en presencia de péptido F9, F9_negat, 13 y 20 (50 μ M) a 37 °C. Se recogieron las células a los 5 min, 30 min y 60 min tras la adición de péptidos, se centrifugaron a 4500 rpm, 5 min a temperatura ambiente. Los sedimentos se lavaron dos veces con un volumen igual de tampón de digestión (sorbitol 2 M, KH_2PO_4 1 M, pH 7,5, EDTA 0,5 M) sin zimolasa, se pesaron y se disolvieron adicionalmente en tampón de digestión que contenía 10 mg de zimolasa 20T (MP Biomedicals, EE. UU.) (5 ml de tampón/1 g de células). La reacción se complementó con 10 μ l de β -mercaptoetanol por 1 ml de tampón de digestión. Las células se incubaron durante 30 min - 45 min a 37 °C. Se determinaron los esferoplastos frente a células intactas en un pequeño volumen de SDS al 0,5% y se observaron bajo el microscopio. Las células intactas no se vieron influenciadas por la presencia de SDS al 0,5% mientras que los esferoplastos solo dejan "fantasmas". Los esferoplastos se recogieron por centrifugación a 2000 rpm, 2 min, TA y se lavaron dos veces con sorbitol frío 1,2 M. De manera importante, todas las soluciones usadas para el aislamiento de esferoplastos contenían mezclas de inhibidor de proteasa (completo sin EDTA, Roche). Finalmente, los esferoplastos se disolvieron en tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) complementado con β -mercaptoetanol al 4%, se coció durante 5 min a 65 °C. Antes de cargar en el gel, se centrifugaron brevemente las muestras. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (gel NuPAGE® de Bis-Tris al 4-12%, Invitrogen) en tampón de ejecución NuPAGE® MES SDS (Invitrogen) a un voltaje continuo de 120 V. Después de la electroforesis, los geles se transfirieron a una bandeja de plástico y se tiñeron las proteínas con azul brillante de Coomassie al 0,25% en metanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante una noche con agitación suave. Los geles se destiñeron en metanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% hasta que las bandas de proteína se volvieron claramente visibles.

1.6.17. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, se usó la prueba de la t de Student. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,001$. El significado estadístico del tratamiento antifúngico se analizó con una prueba de Mann-Whitney (programa informático Analyse-it).

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces por duplicado. Cada ensayo de adhesión de *C. albicans in vitro* o ensayo de biofilms se repitió cinco veces por triplicado. Los biofilms de *C. albicans in vivo* se repitieron cuatro veces, incluyendo siempre dos animales por cepa. Durante la determinación de la susceptibilidad a formar biofilms de *C. albicans*, se probó cada concentración del fármaco por cuadruplicado. Todos los procedimientos experimentales que incluían células TR-146 se efectuaron por duplicado en cinco ocasiones separadas. Los análisis FACS y la determinación de la unión del anticuerpo para *ALS3* se repitieron cinco veces.

40

2. Aplicaciones antibacterianas

2.1 Introducción

La creciente resistencia a antibióticos es un proceso evolutivo inevitable. Hasta ahora, aproximadamente un 90% de las bacterias que provocan infecciones graves son resistentes a la mayoría de los anticuerpos disponibles. La mayoría de los nuevos antibióticos son derivados de los compuestos anteriores o de compuestos que pertenecen a clases bien conocidas. Por lo tanto, hay necesidad de antibacterianos con nuevos mecanismos de acción.

En el presente ejemplo se ha diseñado una biblioteca de péptidos interferidores basados en las secuencias propensas a la agregación presentes en proteínas diana de los genomas disponibles al público de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (cepa de MRSA). Estos genomas se seleccionaron basándose en la relevancia clínica de estas cepas bacterianas; especialmente en el contexto de enfermedades hospitalarias. En el presente ejemplo se ha demostrado que los interferidores diseñados tienen una fuerte actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra una gran variedad de bacterias grampositivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) y también bacterias gramnegativas. Los presentes resultados demuestran de manera convincente que la agregación puede servir como una estrategia antimicrobiana exitosa. Este es un gran avance para el tratamiento de enfermedades nosocomiales, especialmente a la luz de las cepas emergentes resistentes a múltiples fármacos y pan-resistentes.

60

2.2 Exploración primaria de la biblioteca de péptido interferidor, determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se diseñó un total de 50 péptidos interferidores diferentes basándose en la aparición de regiones propensas a la agregación presentes en múltiples proteínas codificadas por los genomas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Debido al diseño de estos péptidos interferidores, es probable que algunas de estas

65

regiones también estén presentes en proteínas de otras especies bacterianas (distantes). En el esfuerzo de selección, se llevó a cabo un procedimiento en dos etapas: 1) selección inicial de todos los péptidos a mayores concentraciones (75-300 µg/ml) seguida de 2) una selección a concentraciones menores (<75 µg/ml) para un conjunto seleccionado de compuestos con una actividad demostrada en la etapa 1). Las bacterias se cultivaron en un incubador con agitación a 37°C y 160rpm en 50 ml de BHI, usando colonias individuales recogidas de una placa de placa fresca de una noche de TSA-sangre de oveja. Los cultivos se cultivaron hasta una densidad de aproximadamente 1×10^5 células/ml y después se diluyeron a 5×10^5 células/ml en CAMHB (Mc Farland 0,5). Cada pocillo contenía 100 µl (50 µl de péptido que contenía MHB más 50 µl de inóculo). La densidad celular final fue de 1×10^5 a 5×10^5 /ml. Después de la adición de la suspensión de células, las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas. La densidad óptica a 590nm (DO₅₉₀) de cada pocillo se midió después de 5 segundos de agitación de la placa usando un espectrofotómetro Perkin Elmer (Contador Multimarcador 1420 Victor 3). El valor de CIM se leyó como la concentración mínima que se necesitó para inhibir completamente el crecimiento de bacterias en un pocillo. Cada pocillo, donde no se observó crecimiento, también se sembró en placas de agar de TSA-sangre de oveja, se incubó a 37°C durante una noche y se inspeccionó visualmente.

Esto proporcionó varias moléculas con alta actividad contra estafilococos y otras especies bacterianas (véase la tabla 4). Además de los compuestos mostrados en la tabla, que se diseñaron principalmente para que fuesen activos contra *S. aureus*, dos moléculas que vale la pena mencionar y que se diseñaron para que fuesen activas contra *S. epidermidis* son C29 (secuencia: RLFNFKRGSRLFNFLKR (SEQ ID NO: 32), es decir, idéntica a Hit11 en la tabla 4) y C30 (RILLGLIRGRSILLGLIRR (SEQ ID NO: 115)).

Tabla 4: Resumen de la potencia *in vitro* de péptidos diseñados contra *S. aureus*. Los resultados mostrados son para péptidos sintetizados en formato de microescala.

Nombre del péptido	Secuencia	Valores de CIM (en µg/ml) contra diferentes especies		
		<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	<i>B.cereus</i> ATCC
Hit50	RFFIALSRRGSRVQAYLYRR (SEQ ID NO: 30)	50	25	>100
Hit1	RWVSMLLRGSRWVSMLLR (SEQ ID NO: 31)	100	50	6
C29 / Hit11	RLFNFKRGSRLFNFLKR (SEQ ID NO: 32)	12,5-25	12,5	6-12,5
Hit14	RRWVSMLLRGSRWVSMLLR (SEQ ID NO: 33)	25	50	100
Hit57A	RFFIGLSRRGSRVQAYLYRR (SEQ ID NO: 34)	100	25	No probado
Hit50A	RFFIGLSRRGSRVQAYLYRR (SEQ ID NO: 78)	100	12,5	50
Hit37	RWVSMLLRGSRVGYVIARR (SEQ ID NO: 114)	100	50	>100

2.2.1. Espectro de los compuestos antibacterianos

En la tabla 4 se muestra la actividad CIM (en µg/ml) de seis péptidos interferidores diferentes que se han seleccionado después de la selección inicial. La estructura de estas moléculas corresponde a la fórmula indicada en la solicitud, donde n es dos, X₁ es 1 aminoácido (Hit50, Hit1, Hit11, Hit57A, Hit50A) o 2 aminoácidos (Hit14), Y₁ es 5 (Hit11) o 6 aminoácidos (los demás), X₂ es dos aminoácidos, Z₁ es un enlazador de dos aminoácidos, X₃ es 1 aminoácido, Y₂ es 5 (Hit11 y Hit 57A) o 6 aminoácidos, X₄ es dos aminoácidos y Z₂ está ausente. Obsérvese que Y₁ e Y₂ pueden ser iguales o diferentes. Cabe destacar que, en los restos Y con una secuencia de 5 aminoácidos, el resto flanqueante K también está presente en proteínas de *S. aureus*, por lo que estas secuencias son idénticas a lo largo de 6 aminoácidos en lugar de 5.

Estos péptidos interferidores se diseñaron originalmente para que se dirigiesen de manera específica a la cepa MRSA de *Staphylococcus aureus*. Debido a la presencia de la misma secuencia propensa a la agregación (es decir, la secuencia TANGO) en los genomas de otras bacterias grampositivas, también hubo actividad de los péptidos interferidores frente a otras especies bacterianas. El péptido interferidor Hit1 ha demostrado ser un interferidor de amplio espectro. Hit14 parece más específico para la cepa bacteriana para la que se diseñó (es decir, *Staphylococcus aureus* MRSA). Hit11, aunque es eficaz contra ambas cepas de estafilococos, es más activo contra *S. epidermidis*, lo que concuerda con el hecho de que la secuencia exacta de las regiones Y está presente con más frecuencia en el genoma de *S. epidermidis*. El valor de CIM (o de concentración inhibitoria mínima) es la concentración más baja de un antibacteriano que inhibirá el crecimiento visible de la bacteria tras la incubación. La concentración bactericida mínima (CBM) se consideró como la concentración más baja de péptido que impidió el crecimiento y redujo el inóculo en un 99,90% en 24 h. Las CBM se determinaron sembrando el contenido de cada pocillo en una placa de agar sangre para comprobar su viabilidad. Además, también se usó el contenido del pocillo

como inóculo para una nueva placa de micropocillos (en la que no se añadió péptido) y se anotó el cambio progresivo de la turbidez durante otras 24 h. Los valores de CBM fueron o iguales o 2 veces mayores que los valores de CIM, lo que sugiere que estos son agentes bactericidas.

- 5 En una etapa posterior, se reorganizaron los péptidos que mantuvieron una alta actividad (CIM baja) a lo largo de selecciones repetidas en forma escalada altamente purificada y se sometieron a pruebas adicionales en varias bacterias grampositivas y gramnegativas. La tabla 5 presenta los valores de CIM del compuesto 30 (C30) para una serie de especies bacterianas. Tal como puede observarse en la tabla 5, el compuesto 30 no solo es muy eficaz contra *Staphylococcus epidemidis*, en cuyo genoma se codifica la secuencia inductora de la agregación, habiéndose
10 usado dicha secuencia para diseñar el compuesto 30, sino también contra otros patógenos clínicamente significativos, tales como *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) y enterococos resistentes a vancomicina (VRE), el patógeno nosocomial *Enterococcus faecalis*, un grupo de patógenos alimentarios: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*. Es muy prometedor ver que la actividad contra cepas resistentes a los antibióticos es igual de elevada que contra cepas sensibles a los antibióticos. Esto es indicativo del nuevo mecanismo de acción completo de estos compuestos antimicrobianos. Ya que la resistencia a antibióticos es un gran problema en los hospitales, las moléculas completamente diferentes ofrecen una gran perspectiva en aplicaciones clínicas.

- Recientemente, se descubrió que C30, al igual que algunos de los compuestos mostrados en la tabla 4, es también activo contra el género *Corynebacterium* (no mostrado en la tabla 5). La actividad contra *Corynebacteriae* es
20 prometedora en vista del nuevo diseño de péptidos contra la tuberculosis, ya que la composición de la pared de *Corynebacterium* imita a la de *Mycobacteriae*. La estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* requiere una atención especial ya que es única entre los procariotas y es un determinante importante de la virulencia para la bacteria. El complejo de la pared celular contiene peptidoglucano, pero por lo demás está compuesto de lípidos complejos. Más del 60% de la pared celular micobacteriana es lípido. La fracción de lípido de la pared celular de MTB consiste en tres componentes importantes, ácidos micólicos, factor de cordón y cera-D. La baja permeabilidad de la pared celular micobacteriana, con su estructura no habitual, se sabe que es un factor importante en esta resistencia. Por lo tanto, los agentes hidrófilos cruzan la pared celular lentamente debido a que la porina micobacteriana no es eficaz para permitir la permeación de solutos y existe a baja concentración. Probablemente, los agentes lipófilos se frenan por la bicapa lipídica que tiene una fluidez infrecuentemente baja y un espesor anormal.

- El mayor valor de CIM de C30 para bacterias gramnegativas puede reflejar el hecho de que la estructura de C30 es un péptido interferidor en tándem (es decir, un péptido con dos series inductoras de la agregación idénticas (2 restos Y idénticos)). Las pruebas recientes han demostrado que los péptidos interferidores individuales también muestran
35 bajos valores de CIM para bacterias gramnegativas. Sin limitar la invención a un mecanismo de acción particular, esto puede indicar al hecho de que las bacterias gramnegativas tienen poros más pequeños en su pared celular bacteriana que podría limitar la entrada de interferidores en tándem en comparación con péptidos interferidores individuales. Sin embargo, obsérvese también que hay varias proteínas que contienen las series inductoras de la agregación y estos grupos de proteínas no son idénticos en bacterias grampositivas y gramnegativas. Por lo tanto, puede darse el caso de que una o más proteínas diana se agreguen en bacterias grampositivas que en las gramnegativas.

Resultados en bacterias planctónicas: Valores de CIM para el compuesto 30

- 45 Tabla 5: Valores de CIM para el compuesto 30 (C30) frente a una gran variedad de especies grampositivas y gramnegativas. Además, la tabla también incluye 7 cepas MRSA y 7 VRE. La lectura para los valores de CIM se efectuó después de 18 horas de crecimiento.

- | | |
|--|---|
| • Gramnegativas | • Grampositivas |
| • <i>E. coli</i> ATCC25922: 100 µg/ml | • <i>S. epidemidis</i> ATCC 13228: 1,5 µg/ml |
| • <i>Ps. aeruginosa</i> ATCC27853: > 100 µg/ml | • S101: 1,5 µg/ml |
| • Grampositivas | • S103: 1,5 µg/ml |
| • <i>S. aureus</i> ATCC29213: 3 µg/ml | • S104: 1,5 µg/ml |
| • MRSA 204: 6 µg/ml | • S109: 3 µg/ml |
| • MRSA 418: 6 µg/ml | • <i>S. capitis</i> : 1,5 µg/ml |
| • MRSA 274: 3 µg/ml | • <i>S. hominis</i> : 3 µg/ml |
| • MRSA 165: 3 µg/ml | • <i>S. haemolyticus</i> : 1,5 µg/ml |
| • MRSA 351: 3 µg/ml | • <i>Nocardia asteroides</i> ATCC 3308: 1,5 µg/ml |
| • MRSA 115: 6 µg/ml | • <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341: 3 µg/ml |
| • MRSA 651: 3 µg/ml | • <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 11994: 1,5 µg/ml |
| • <i>E. faecalis</i> ATCC 19433: 6 µg/ml | • <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051: 1,5 µg/ml |
| • VRE 8: 3 µg/ml | • <i>Bacillus subtilis</i> IP 5832: 6 µg/ml |
| • VRE 11: 1,5 µg/ml | • <i>Bacillus cereus</i> 1: 6 µg/ml |
| • VRE 12: 12,5 µg/ml | • <i>Bacillus cereus</i> 2: 6 µg/ml |
| • VRE 40: 3 µg/ml | |
| • VRE 60: 3 µg/ml | |

- Gramnegativas
- VRE 70: 1,5 µg/ml
- VRE 54: 3 µg/ml
- Grampositivas

2.2.2. Efecto de la pureza y las modificaciones en la actividad peptídica

5 Se ha observado una mejora significativa (de hasta 5 veces) de la actividad de los péptidos interferidores cuando se sintetizaron en una forma altamente pura. Los resultados de esta actividad mejorada se muestran en la tabla 6. De manera importante, esta mejora de la actividad no aumenta la toxicidad contra células de mamífero (datos no mostrados). Además, se ha descubierto que los péptidos interferidores marcados con biotina fueron tan activos como los péptidos interferidores no marcados. Esto significa que pueden usarse diferentes métodos de detección.

10 Tabla 6: Resumen de la concentración inhibitoria mínima in vitro contra diferentes bacterias de los péptidos con una pureza de > 95% (HPLC-220nm-C18-gradiente lineal) diseñados contra S. aureus MRSA.

Nombre del péptido	Secuencia	Valores de MIC (µg/ml) contra diferentes especies			
		S.aureus ATCC 29213	MRSA 326	S.epidermidis ATCC 12228	Corynebacterium
Hit50	RFFIALSRRGSRVQAYLYRR (SEQ ID NO: 30)	25	50	3	12,5
Hit1	RWVSMLLRGSRWVSMLLR (SEQ ID NO: 31)	3	6	1,5	3
C29/Hit11	RLFNFLKRGSRFLNFLKR (SEQ ID NO: 32)	12,5-25	12,5	0,6-3	6
Hit14	RRWVSMLLRGSRWVSMLLR (SEQ ID NO: 33)	12,5	No probado	50	No probado
Hit57A	RFFIGLSRRGSRFLNFLKR (SEQ ID NO: 34)	50	6	3-6	No activo
Hit50A	RFFIGLSRRGSRIQAYLYRR (SEQ ID NO: 78)	100	50	6	No probado
Hit37	RWVSMLLRGSRVGYVIARR (SEQ ID NO: 114)	100	100	6	No probado

15 En la tabla no se muestra Hit24. La secuencia de Hit24 (es decir, RRLFNFLKRGSRFLNFLKR (SEQ ID NO: 74)) es una secuencia modificada de Hit 11 (véase la tabla 4), en donde Hit24 tiene un doble resto constitutivo en la parte delantera. Aunque no se probó contra todas las bacterias, tiene una actividad considerable contra S. aureus ATCC 29213 (valor de CIM 12,5 µg/ml), S.epidermidis ATCC 12228 (CIM 1,5 µg/ml) y la gramnegativa E. cloacae (25 µg/ml).

20 Aparte de biotilación, se probaron varias otras modificaciones de los interferidores. Estos se basaron en C30 e incluyen una versión de D-aminoácidos de C30.

25 Otra modificación que se probó es la PEGilación del péptido C30. Se probó la unión covalente de PEG en una posición diferente del péptido C30. Se usó como un resto tanto interno (es decir, como el resto enlazador Z_i) como N-terminal. El objetivo de la introducción de PEG fue principalmente proporcionar una mejor estabilidad del compuesto in vivo, así como una mejor solubilidad.

Los siguientes compuestos, basados en la secuencia de C30 (SEQ ID NO: 115), se han sintetizado:

- 30 P2170: Ac-RILLGLIRRGSRILLGLIRR-CONH₂, una versión acetilada y amidada de C30.
- P2175: NH₂-RILLGLIRR(Peg)₂RILLGLIRR-CONH₂, una versión amidada de C30 en donde el enlazador Z₁ entre las regiones agregantes consta de dos unidades de EPG (es decir, dos unidades de óxido de etileno unidas mediante un enlace éter) en lugar de la secuencia de aminoácidos GS.
- 35 P2151: NH₂-RILLGLIRRGSRILLGLIRR-OH, C30 normal pero preparado usando diferentes síntesis químicas de péptido.
- P2153: NH₂-(Peg)₂RILLGLIRRGSRILLGLIRR-OH, C30 que está fusionado en N-terminal a dos unidades de PEG. Esto puede formularse como C30 con un resto Z₀ adicional que consta de dos unidades de PEG.
- 40 P2154: NH₂-Peg₃RILLGLIRRGSRILLGLIRR-OH, C30 que está fusionado en N-terminal a tres unidades de PEG. Esto puede formularse como C30 con un resto Z₀ adicional que consta de tres unidades de PEG.

DAA: una versión de D-aminoácidos de C30 en donde todos los aminoácidos son D-aminoácidos.

Estos péptidos se probaron del mismo modo que para las selecciones originales. Se usó un método de dilución de microcaldo con diluciones de factor dos en CAMHB (de acuerdo con las guías de la EMEA) para la evaluación de la actividad del péptido, con concentraciones en el intervalo de 03 µg/ml a 200 µg/ml.

Los resultados se muestran en la tabla 7. Para P2170 y P2175, se probaron dos fracciones correspondientes a dos picos obtenidos durante la síntesis de péptido. Estos se indican como P1 y P2, respectivamente.

Tabla 7. Valores de CIM para cepas bacterianas seleccionadas para péptidos C30 modificados.

Tipo de bacteria	Concentraciones inhibitoras mínimas CIM ₉₀ (µg/ml)				DAA	P2151	P2153	P2154
	P2170/P1	P2170/P2	P2175/P1	P2175/P2				
S. aureus ATCC	12,5	12,5	100	100	25	50	25	25
S. epidermidis ATCC12228	6	12,5	12,5	6	1,5	12,5	12,5	12,5
B. cereus	6	6	12,5	12,5	6	12,5	6	12,5
MRSA 326	12,5	12,5	25	25	6	12,5	12,5	12,5
E. coli ATCC	25	25	25	50	25	25	25	50
Corynebacterium	>200	100	>200	>200	>200			
E. faecalis ATCC 1943	12,5	12,5	12,5	6	6	25	25	12,5
Klebsiella pneumoniae	>200	>200	50	100	25	25	50	100
Nocardia asteroides 3908	6	3	3	6	>200	12,5	6	6
S. hominis DSM20328	3	3	3	1,5	1,5	3	3	3
Salmonella typhi ATCC14028	100	100	50	25	100	100	>200	>200

Tal como puede observarse a partir de la tabla, todos los péptidos modificados conservan una actividad antibacteriana que es comparable a la de C30 no modificado. Por lo tanto, las modificaciones, tales como D-aminoácidos y PEGilación no tienen un efecto negativo en la actividad de las moléculas presentadas en el presente documento. Es particularmente alentador que los valores de CIM (y por lo tanto, la actividad antibacteriana) no se vieron afectados por la PEGilación.

2.2.3 Péptidos de control no agregantes

Para validar el principio de diseño de los agregadores se construyeron péptidos de control, denominados en el presente documento como "desordenados". Estos están compuestos por los mismos aminoácidos que los agregadores originales (y por lo tanto, tienen la misma carga), pero se desordena el orden de tal forma que dejan de cumplir con los principios de diseño presentados en el presente documento. Estos péptidos no dan como resultado la inhibición del crecimiento o la supervivencia bacteriana.

2.2.4. Uso como diana de más de una proteína bacteriana

Como se ha mencionado, una primera exploración se basó en la identificación de regiones propensas a la agregación en proteínas codificadas por los genomas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Como un compuesto altamente prometedor, C30, contiene secuencias inductoras de la agregación que están presentes en más de una proteína en estos genomas, se barajó la hipótesis de que esto podría usarse en el diseño de nuevos compuestos. Por lo tanto, en una etapa posterior, se diseñaron péptidos interferidores para los que había disponible más de una diana prevista en las células bacterianas de *S. epidermidis* y *S. aureus* (es decir, que contienen secuencias beta-agregantes que están presentes en más de una proteína codificada por cualquiera de estas bacterias). Esta selección de péptido interferidor denominada "mtop" mostró una alta tasa de acierto, lo que indica que el diseño de péptidos interferidores antibacterianos puede estar basado en una serie de dianas disponibles en la célula bacteriana (es decir, cuantas más proteínas diana que contengan una región TANGO concreta, mayores posibilidades habrá de obtener un efecto bactericida con el interferidor). Esto es lógico, ya que cuantas más proteínas se usen como diana, mayores probabilidades habrá de que al inhibir una o más de estas se inhiba una función esencial. La tabla 8 muestra la actividad CIM de péptidos interferidores biospecíficos que se diseñaron basándose en el hallazgo de más de una proteína diana en la bacteria. Es importante mencionar que los interferidores usados en la tabla 5 se sintetizaron en formato de microescala; esto significa que se espera una mejora considerable de la actividad del interferidor para los péptidos interferidores de alta pureza.

Las moléculas listadas en la tabla 5 corresponden a la fórmula indicada en la solicitud, donde n es 2, X₁ y X₄ son dos aminoácidos, Y₁ e Y₂ son 6 aminoácidos, X₂ y X₃ son 1 aminoácido, Z₁ es un enlazador de dos aminoácidos y Z₂ está ausente.

Tabla 8: Valores de CIM de varios péptidos interferidores multidiana

Nombre	Secuencia	Cepa bacteriana	Valor de MIC ($\mu\text{g/ml}$)
mtop_1	RRILFILRPPRLILFLGRR (SEQ ID NO: 35)	<i>S. epidermidis</i>	50
		<i>S. aureus</i>	200
mtop_4	RRILSLIRPPRLGVLRR (SEQ ID NO: 36)	<i>S. epidermidis</i>	3
		<i>S. aureus</i>	100
mtop_5	RRVLSLIRPPRIALLGLRR (SEQ ID NO: 37)	<i>S. epidermidis</i>	25
		<i>S. aureus</i>	100
mtop_6	RRIALLLIRPPRLLAIVRR (SEQ ID NO: 38)	<i>S. epidermidis</i>	50
		<i>S. aureus</i>	>200
mtop_11	RRILLGLIRPPRTIIGLVRR (SEQ ID NO: 39)	<i>S. epidermidis</i>	12,5
		<i>S. aureus</i>	>200
mtop_12	RRILLIARPPRILLGAIRR (SEQ ID NO: 40)	<i>S. epidermidis</i>	12,5
		<i>S. aureus</i>	>200
mtop_17	RRLGLIIRPPRAIALTLRR (SEQ ID NO: 41)	<i>S. epidermidis</i>	100
		<i>S. aureus</i>	50
mtop_18	RRILGLIARPPRIAFVILRR (SEQ ID NO: 42)	<i>S. epidermidis</i>	50
		<i>S. aureus</i>	>200
mtop_22	RRIIGIARPPRVLVTLRR (SEQ ID NO: 43)	<i>S. epidermidis</i>	50
		<i>S. aureus</i>	>200

2.3 Cinética de eliminación antimicrobiana de las moléculas interferidoras

- 5 Se obtuvieron curvas de tiempo-eliminación para estudiar la cinética de la actividad bactericida. Los compuestos C30, Hit50 y C29 (véase lo anterior para sus secuencias) se probaron contra la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* ATCC a la CIM de los compuestos y dos veces el valor de CIM. Se demostró que el compuesto C30 redujo los recuentos viables en un 100% en 5 min, mientras que Hit50 redujo los recuentos viables en ~3 log unidades después del mismo periodo de incubación, ambos a una concentración que igualaron su valor de CIM (véase la figura 11). Todos los péptidos mostraron una actividad dependiente de la concentración, ya que al duplicar la concentración al doble del valor de CIM se obtuvo como resultado una eliminación más rápida. Por ejemplo, el tiempo necesario para reducir a la mitad el número de UFC/ml para C29 fue de 60 minutos (a la concentración inhibitoria mínima) y solo 10 minutos para 2xCIM. Este es un efecto importante, ya que generalmente se cree que los antibióticos que tienen un efecto bactericida más rápido son más eficaces y se desarrolla más lentamente la resistencia a dichos compuestos.

2.4 Control del desarrollo de resistencia bacteriana contra interferidores antibacterianos

20 Se evaluó la capacidad de la cepa clínica de *S. aureus* MRSA 204 para desarrollar resistencia al interferidor C30 mediante pases repetidos y determinación de CIM. Se usaron células de *S. aureus* que crecieron en presencia de C30 a la mitad de la CIM en el día uno al día siguiente en un ensayo de CIM del mismo compuesto. De este modo, se expuso de manera continua a las células a un solo compuesto (es decir, C30) a la mitad del valor de CIM sin pases durante 15 días. Se pudo demostrar que la exposición continua al péptido interferidor C30 dio como resultado una tendencia mínima al desarrollo de resistencia ya que se necesitaron diez pases a la mitad de la CIM inicial para elevar la CIM al doble. Se necesitaron nueve pases a menos de la CIM antes de que se elevase 2 veces la CIM, aunque esta resistencia no se mantuvo con el tiempo y tras 12 pases, la CIM volvió a su valor original. Véase la fig. 15. Se obtuvieron resultados similares con otros de los péptidos listados anteriormente. Cuando se controló la resistencia a lo largo de un periodo de tiempo más largo (31 en lugar de 15 días) no se observó un aumento adicional del valor de CIM (véase más adelante).

30 Sin embargo, la CIM de la rifampina aumenta significativamente durante el mismo periodo de tiempo (hasta 512 veces a lo largo de 15 días) - la rifampina es un agente contra el que se sabe que surge fácilmente resistencia debido a mutaciones puntuales cromosómicas espontáneas. De manera similar a los péptidos probados, la CIM de la vancomicina en estas condiciones solo aumentó dos veces; la vancomicina se considera generalmente un antibiótico contra el que es improbable que se desarrolle resistencia espontánea en condiciones donde se excluye la transferencia genética horizontal entre especies. Cabe mencionar que los compuestos se dirigen a regiones hidrófobas enterradas dentro de las proteínas. Se cree que estas regiones se encuentran generalmente bien conservadas y no pueden mutarse fácilmente, ya que esto ocasionaría proteínas mal plegadas (no funcionales). Sin quedar ligados a un mecanismo particular, esto puede contribuir al lento desarrollo de resistencia observado.

40 Ya que el desarrollo de resistencia es un proceso estocástico, se repitió el experimento anterior usando el mismo

método de microdilución de caldo (siempre 4 duplicados) y también añadiendo antibióticos comunes, tales como ampicilina y gentamicina. Puede observarse que tanto C30 como C29 muestran una aparición mucho más lenta de resistencia que la ampicilina y que los valores de CIM aumentan considerablemente menos que los de gentamicina y ampicilina (fig. 12). Obsérvese que, ya que los valores de CIM iniciales de la gentamicina son menores que los de los compuestos, el múltiplo de aumento es mucho más pronunciado que el mostrado en la figura.

Una segunda serie de experimentos consistió en la inoculación de 2 ml de caldo BHI complementado con concentraciones definidas del péptido C30 con una cepa MRSA 326. Cada día, se evaluó la CIM como se ha descrito anteriormente. La concentración del péptido en el medio se ajustó de acuerdo con la CIM del día anterior, de tal forma que el medio de crecimiento soportó la selección de resistencia. Esto se repitió 3 veces durante 31 días. La CIM para C30 mostró fluctuaciones similares a las del experimento anterior y nunca aumentó más de 4 veces. En el último día del experimento, la CIM fue de 12,5 µg/ml. En comparación, el nivel de CIM para las células tratadas con ampicilina fluctuó ampliamente, aumentando hasta 7 veces (CIM al final del experimento = 100 µg/ml). El aumento de las concentraciones de ampicilina durante las incubaciones durante una noche dio lugar a la selección de bacterias resistentes y un aumento adicional en el nivel de CIM, mientras que el aumento de la concentración de C30 no aceleró el desarrollo de resistencia. Los resultados se muestran en la fig. 13.

De manera interesante, la supresión de C30 del cultivo provocó una reducción del nivel de CIM del 50% o no tuvo efecto alguno en la susceptibilidad de la cepa.

2.5 Permeabilidad de membrana causada por interferidores antibacterianos

Se estudió el efecto de los péptidos interferidores en las membranas de células microbianas vivas con el colorante Sytox Green (Invitrogen) de unión a ADN no permeable a membrana. La permeabilización permite la entrada del colorante, que se controla por un aumento en la fluorescencia. La tinción del ácido nucleico con Sytox Green se usó para controlar la permeabilidad de la membrana bacteriana con el tiempo (a una concentración constante del péptido interferidor de 25 µg/ml (véase la figura 18) y a diversas concentraciones de péptidos (véase la figura 19) con un tiempo constante de 15 minutos). Se observó un pronunciado aumento en la unión de Sytox Green en los primeros 5 minutos, que se estabilizó transcurrido este punto de tiempo, con un pequeño aumento adicional menor tras 5 minutos. Este pequeño aumento adicional podría atribuirse a la rápida inserción de los péptidos interferidores anfífilos en la bicapa lipídica bacteriana, que induce defectos locales en el empaquetado de lípidos y provoca una permeabilidad mejorada adicionalmente. En comparación con el agente de control lítico (lisostafina), que lisa de manera muy eficaz a *Staphylococcus*, la señal de Sytox Green fue ligeramente menor para las bacterias tratadas con interferidores antibacterianos. La figura 11 muestra que la curva de eliminación de *S. aureus* tratadas con compuesto 30 a 3 µg/ml (que es aproximadamente su valor de CIM) pudo destruir estas bacterias muy rápidamente (ya que la eliminación era dependiente de la concentración); por lo tanto, podría esperarse que se produzca un aumento igualmente rápido en la unión de Sytox Green en caso de que la lisis de la membrana sea el mecanismo de acción. Sin embargo, no es el caso. Para apoyar la hipótesis de que la lisis de membrana no es una causa principal de muerte celular, se ha progresado con estrategias proteómicas para verificar la diana intracelular que está implicada en la interacción péptido primario-diana, así como con análisis de microscopía electrónica para mostrar células intactas.

En una etapa posterior, se estudió el potencial de carga de membrana (MP) para el péptido interferidor C30. Para esto, se usó el kit BacLight (Invitrogen). La figura 20 muestra que en las células bacterianas tratadas con el compuesto C30, hubo una reducción significativa en la fluorescencia roja tras solo 5 minutos, presentando una relación de rojo a verde igual, que indica una despolarización completa de MP. En comparación, el control lítico (lisostafina) mostró una despolarización de la membrana mucho más lenta. El patrón de la gráfica de puntos de células tratadas con C30 es muy similar al control despolarizado. Cuando se combinan estos datos, se puede asumir que tras 5 minutos de tratamiento con C30 se produce un colapso en la MP, que da lugar a un flujo de entrada del colorante de ácido nucleico Sytox Green, que indica hasta cierto punto permeabilización de la membrana. La despolarización causada por estos interferidores mostró ser dependiente del tiempo en lugar de dependiente de la concentración (datos no mostrados). Estos resultados demuestran además el rápido mecanismo de acción bactericida de los interferidores antibacterianos.

2.6 Detección de agregados en bacterias

Los agregados se visualizaron en bacterias tratadas con interferidor antibacteriano con dos colorantes para el diagnóstico de amiloide diferentes (tioflavina T (Th-T) y rojo Congo). La fluorescencia de tioflavina T se ha descrito como un marcador específico para la conformación de lámina extendida de las estructuras beta-agregadas. Cuando este colorante se une a las fibrillas de amiloide, se produce un gran aumento en la fluorescencia de Th-T en relación con el colorante libre. Se usó Th-T en los ensayos bacterianos para investigar si los péptidos interferidores inducen la agregación en estas células bacterianas. Como control, se usaron diluciones de factor dos del péptido interferidor solo en agua fisiológica, para asegurarse de que los péptidos autoagregantes externos no dan lugar a una señal falsa. Se observó claramente un aumento dependiente de la concentración significativo en la unión del colorante Th-T en células bacterianas tratadas con péptidos interferidores (véase la figura 21), lo que indica la presencia de más estructuras de β-lámina en las células bacterianas tratadas con péptidos interferidores. Además, también se

demonstró que el rojo Congo (CR) se une a las estructuras beta agregadas (véase la figura 22) y esta unión induce un cambio característico en la absorbancia óptica máxima de CR de 490 nm a 540 nm. Este experimento confirma el experimento de unión dependiente de la concentración de Th-T, confirmando de manera independiente el aumento en la formación de β -estructura durante el tratamiento con el péptido.

5

2.7 Cambios morfológicos inducidos por los interferidores en bacterias

Se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para examinar los cambios ultra estructurales en bacterias inducidos por los péptidos interferidores. Se usaron tanto estafilococos como bacilos por comparación. Pudo observarse que tanto *Bacillus cereus* como *Staphylococcus aureus* presentaron una superficie lisa e intacta tras 5 minutos de tratamiento con el interferidor antibacteriano C30, sin mostrar evidencias de cráteres, agujeros o poros en su envuelta. Sin embargo, tras 20 minutos, la superficie de los bacilos comenzó a arrugarse y encoger tras el tratamiento, lo que no fue evidente en los estafilococos probablemente debido a su pequeño tamaño redondo. En ambas especies bacterianas el contenido celular empezó a liberarse, en los bacilos tan solo tras 20 minutos (véase la figura 23, panel derecho, parte inferior) de tratamiento y en *S. aureus* tan solo tras 1 hora (véase la figura 24). Durante la división celular sana, *Bacillus cereus* forma cadenas muy largas, que no se separan de las células madre. Sin embargo, se registró que en las poblaciones de células bacterianas de *Bacillus cereus* tratadas con péptido C30 estas cadenas largas son menos comunes, lo que indica una división celular alterada. Se pudo extraer una conclusión similar por el hecho de que una cantidad significativamente menor de los estafilococos tratados contenían septos de división en comparación con células bacterianas sanas no tratadas. Finalmente, se puede concluir que los datos de SEM ilustran la ausencia de una rápida lisis. Además, sabiendo que el compuesto 30 necesita tan solo 5-10 minutos para eliminar a los estafilococos, podría esperarse una ruptura de las células bacterianas muy rápida, lo que evidentemente no era el caso incluso tras una hora de tratamiento con el interferidor antibacteriano. Para apoyar adicionalmente esta hipótesis, también se observaron secciones ultrafinas de estafilococos tratados con C30. La microscopía electrónica de transmisión de estas células tratadas también confirma la ausencia de lisis, aunque hay una reducción evidente del citoplasma (véanse las figuras 25 y 26). Además, hay un aumento en la densidad electrónica en una región de ácido nucleico, lo que sugiere su condensación. La condensación del ADN es una de las etapas tardías de las respuestas apoptóticas. La muerte celular apoptótica podría soportarse por el análisis en gel en dos dimensiones efectuado, que reveló un aumento de 3 veces en la expresión de la familia del regulador transcripcional MarR, implicado en la actividad autolítica. El análisis por microscopía electrónica de transmisión de las secciones ultrafinas de *Staphylococcus aureus* tratadas con compuesto 30 mostró estructuras membranosas (véase la flecha en la figura 25) que previamente se habían descrito como mesosomas.

35 Análisis por microscopía inmunoelectrónica

Se estudió la localización del agregador inmunomarcado usando microscopía electrónica de transmisión. A tal efecto, se marcó el péptido C30 con 5(6)carboxifluoresceína en su extremo N-terminal (marcador de FITC).

40 Se trataron células en fase de crecimiento exponencial con péptido marcado con FITC (valor de 2xCIM) durante 30 minutos seguido de fijado con fijativo de doble fuerza (paraformaldehído al 4% + glutaraldehído al 0,4% en tampón P 0,1 M, pH 7,4) durante 10 minutos y fijativo de fuerza sencilla (la mitad de la anterior) durante 1 hora. Después de varias etapas de lavado (tampón P y tampón P/glicina) se resuspendió el sedimento en gelatina al 12%/tampón p, se incubó sobre hielo, se cortó en cubos pequeños y se dejó incubar durante una noche en sacarosa 2,3 M. Las muestras se montaron sobre soportes para especímenes, se congelaron en nitrógeno líquido y se seccionaron con un cuchillo de diamante a -100°C con un ultramicrotomo Ultracut S/FCScryou (Leica). Las secciones ultrafinas descongeladas se colocaron en rejillas de cobre (malla 400) recubiertas con Formavarcarbon, se sometieron las secciones a flotación seis veces durante 10 minutos cada vez sobre gotas con glicina-PBS. Después, se lavaron las rejillas en tampón PBS 10 mM durante 5 minutos, se bloquearon con PBS/BSA (0,1%) y se incubaron durante 30 minutos en una gota de anticuerpo primario de cabra anti-FITC (Abcam) (diluido a 1:1000 en tampón de PBS), se lavaron 5 veces en tampón PBS, se incubaron durante 30 min con conjugado de conejo anti-proteína A de cabra-oro (5 nm; BBIInternational EM Rag5) diluido a 1:50 en tampón PBS. Después, se lavó la sección 6 veces durante 5 minutos en PBS y 3 veces en ddH₂O. Las rejillas se tiñeron durante 5 minutos con acetato de uranilo-metilcelulosa (1%) sobre hielo, se secaron cuidadosamente y se observaron usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2100, funcionando con un voltaje de aceleración de 80kV. No se detectó unión no específica importante de los anticuerpos en los diferentes procedimientos de control, el marcaje de fondo fue un problema mínimo y la mayoría de las veces, relacionado con etapas de lavado insuficientes después de la incubación con proteína A-oro, que se había optimizado.

60 Después de 30 minutos de exposición, los péptidos FITC-C30 estaban presentes predominantemente en el citoplasma bacteriano, agrupados en una forma de agregados (figura 27, flechas rojas). Debido a que no se observó unión específica, las partículas marcadas con inmunoro representan la presencia de péptidos. Estos resultados confirman la actividad intracelular de los péptidos. Además, las células tratadas con péptido tienen un proceso de división claramente alterado. La división de las células tratadas con péptido es asimétrica cuando se comparó con los estafilococos no tratados; los septos también son mucho más gruesos y pierden su margen. Curiosamente, los cúmulos agregados solo pudieron verse en una parte de la célula, lo que sugiere presión evolutiva contra la herencia

65

de agregados, un proceso previamente descrito en *E. coli* (Rokney, A., M. Shagan, et al. (2009). "E. coli Transports Aggregated Proteins to the Poles by a Specific and Energy-Dependent Process." *Journal of Molecular Biology* 392(3): 589-601; Lindner, A. B., R. Madden, et al. (2008). "Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(8): 3076-3081).

El análisis morfológico y los estudios de permeabilidad de membrana en bacterias tratadas parece sugerir que los péptidos interferidores se insertan en la membrana citoplasmática bacteriana, ocasionando una rápida despolarización de la membrana y la pérdida de su integridad. Sin quedar ligados a un mecanismo particular, este no parece ser su modo de acción bactericida, sino más bien un "efecto secundario". Los péptidos interferidores son activos únicamente en bacterias que codifican en su genoma la región β -agregante también presente en la molécula interferidora. Los interferidores son capaces de inducir la agregación de sus dianas, ocasionando la muerte celular. Por lo tanto, se baraja la hipótesis de que la combinación de la agregación de la diana intracelular y el efecto de membrana dé lugar a la rápida muerte celular de las bacterias.

2.8 Toxicidad de interferidores antibacterianos en células de mamífero

2.8.1 Ensayo de hemólisis

Para distinguir entre actividad antimicrobiana selectiva de la actividad lítica no selectiva en células eucariotas, se midieron las capacidades líticas de los péptidos interferidores más activos usando eritrocitos humanos. Tal como se muestra en la figura 14, los compuestos: C29, Hit57A, Hit 50 y Hit24 no mostraron una actividad hemolítica significativa a concentraciones clínicamente relevantes, mientras que los péptidos C30 y Hit1 tenían HD_{50} (concentración a la cual se lisan un 50% de los glóbulos rojos) en el intervalo de entre 25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$. Como control positivo se usó el detergente Tween, que provoca una lisis del 100% de los RBC. Se pudo demostrar que los péptidos interferidores no muestran una hemólisis importante a sus valores de CIM (véase la tabla 4) y algunos péptidos interferidores no son siquiera hemolíticos a concentraciones tan altas como de 100 $\mu\text{g/ml}$.

2.8.2 Ensayo de Alamar Blue y ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en células de mamífero

Las células de riñón embrionario humano (HEK293T) tratadas con diferentes concentraciones de péptido interferidor antimicrobiano C30 dieron como resultado mayores niveles de liberación de LDH cuando se comparó con el péptido interferidor Hit50. Se observó un aumento dependiente de la concentración en la LDH extracelular, lo que indica que estos péptidos causaron cierta pérdida de la integridad de la membrana plasmática. La figura 16 muestra que el péptido interferidor C30 provoca una liberación de LDH mayor del 50% cuando se usó a 50 $\mu\text{g/ml}$ o mayor, mientras que el péptido interferidor hit 50 provocó una liberación de LDH de tan solo el 5% a la misma concentración (véase la tabla 4).

El ensayo de Alamar blue permitió el control del porcentaje total de recuperación del crecimiento celular con el tiempo en presencia de péptidos. Para la mayoría de los péptidos interferidores (a una concentración tan alta como 100 $\mu\text{g/ml}$) se observó que un 80-100% de las células de mamífero mostró una recuperación completa del crecimiento en 3-24 horas. La figura 17 muestra la citotoxicidad de Alamar blue en células de riñón embrionario humano (línea celular HEK293T) para dos péptidos interferidores diferentes. A pesar de la liberación de LDH provocada por las altas concentraciones de C30, puede observarse que con concentraciones menores de 100 $\mu\text{g/ml}$, la viabilidad de las células de mamífero no se ve afectada significativamente por la administración de este compuesto. Los datos indican la especificidad de los péptidos interferidores antibacterianos para bacterias, con un efecto tan solo mínimo en las células de mamífero.

2.8.3 Ensayo de invasión

En este ensayo, se cultivaron monocapas de células HCT116 (una línea celular de tumor de colon humano) en el fondo de una placa de micropocillos. Al día siguiente, se añadieron bacterias frescas de *S. aureus* ATCC 27853 (aproximadamente 10^6 UFC/ml) y se incluyó un control negativo no infectado. Después de 90 minutos de infección, se añadieron diferentes diluciones de péptido y los cultivos se incubaron durante otra hora. Como control positivo se usó gentamicina, dado que tiene una buena actividad intracelular. Cada pocillo se lavó con agua fisiológica precalentada para eliminar cualquier bacteria extracelular, seguido de tratamiento con Triton al 1% para liberar todas las bacterias atrapadas de las células de mamífero. El contenido de los pocillos se diluyó en serie y se sembró sobre placas de TSA agar para el conteo de las UFC. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 28.

Cabe destacar que, la concentración de péptido puede reducirse adicionalmente a tan solo 12,5 $\mu\text{g/ml}$ mientras que se mantiene una actividad antibacteriana similar. Esto es interesante para evitar los efectos secundarios tóxicos que pueden surgir con altas concentraciones de los péptidos. De cualquier modo, estos resultados demuestran que los péptidos agregadores son tolerados por las células de mamífero a concentraciones relevantes para el efecto bactericida y pueden atacar de manera selectiva a *S. aureus* que residen en las células de tumor de colon humano (HCT-116) cultivadas (es decir, son captados por las células y muestran un efecto bactericida).

2.9 Análisis proteómico de proteínas diana

La tecnología de agregación se basa en la suposición de que series cortas de aminoácidos, con una alta propensión a la agregación (por ejemplo, evaluada mediante la puntuación TANGO) y que proceden de una proteína diana, pueden inducir la agregación de esa proteína. Esta hipótesis se ha confirmado mediante un análisis proteómico masivo de la fracción insoluble. Si se asume que los presentes péptidos agregadores funcionan mediante la interacción específica con su diana y causa agregación, se espera que la diana entre en la fracción insoluble. Por este motivo, se decidió separar el lisado en 2 fracciones: insoluble y soluble y comparar estas con fracciones celulares no tratadas. Se asumió que las proteínas presentes en las fracciones insolubles tanto tratadas (TC30) como no tratadas (NT) presentaban un fondo de proteínas no específicas naturalmente no solubles. Además, se examinaron fracciones solubles de bacterias tanto tratadas como no tratadas y tal como se esperaba, la proteína de interés estaba presente únicamente en la fracción no tratada. Esto significa que se usaron los siguientes criterios para buscar la diana:

1) las dianas de agregación potenciales son proteínas obtenidas de la lista de proteínas en la fracción insoluble de células tratadas con C30 menos las proteínas en la fracción insoluble de células no tratadas

2) las proteínas en la fracción de células tratadas con C30 menos las proteínas en la fracción soluble de células tratadas con C30 son dianas potenciales solo si están ausentes en la fracción de NT insoluble, Y si están presentes en la fracción de NT soluble y solo cuando contiene la secuencia tanto o una parte de la misma en su secuencia de aminoácidos.

Mediante el método SOSPA (por sus siglas en inglés, análisis proteómico masivo recortado) se puede confirmar la proteína diana para cada uno de los agregadores. De este modo, se ha confirmado hasta ahora la diana para el compuesto 30 en dos cepas bacterianas diferentes: *S. aureus* y *B. cereus*. Las fracciones insolubles de ambas especies tratadas contenían la proteína predicha *in silico*; es decir, el regulador negativo de competencia genética ClpC/mecB que de hecho, contiene la serie Tango en su secuencia FASTA (Número de referencia de Uniprot: Q63HB8). Tal como se esperaba, la proteína diana de C30 cambió de la fracción soluble a la insoluble tras el tratamiento con el péptido.

Además, se transfirieron diferentes fracciones y se usaron estas transferencias para detectar la diana con péptidos de reconocimiento específicos. Nuevamente, se pudo confirmar la presencia de la proteína diana, ClpC/MecB (90kDa) en la fracción insoluble de *Bacillus cereus* tratadas con C30 (fig. 29).

En conjunto, estos resultados confirman la hipótesis de que los agregadores poseen la capacidad de interactuar con las membranas bacterianas (actividad interfacial), penetran en el citoplasma de las bacterias y si la diana tiene la región tango accesible, el agregador se une a esta, agregándola y de este modo iniciando una reacción en cadena posterior. Tal como se ha mencionado en la bibliografía, los agregados provocan reorganizaciones de lípidos y la permeabilización de la membrana. Un análisis por microscopía electrónica exhaustivo demuestra que los agregadores actúan en la membrana desde el interior de la célula y no desde el exterior. Se concluye que los agregadores actúan tanto en proteína diana citoplasmática y en la etapa tardía, en la propia membrana, ocasionando una rápida muerte celular.

Los datos obtenidos mediante SOSPA también pudieron confirmarse usando electroforesis en gel en dos dimensiones (datos no mostrados).

2.10 Estabilidad sérica de los interferidores antibacterianos y detección en suero

Para evaluar la actividad del interferidor en presencia de suero, se determinaron valores de CIM para *S. aureus* (como se ha descrito anteriormente) para varios péptidos interferidores antibacterianos en un medio que contenía suero bovino fetal al 50%. Tal como se esperaba, la tabla 9 demuestra que los valores de CIM fueron hasta cierto punto mayores en presencia de suero, pero de manera importante, los péptidos interferidores conservaron su actividad antimicrobiana, lo que indica un posible uso *in vivo* de los péptidos interferidores antibacterianos.

Tabla 9: Valores de CIM para varios interferidores antibacterianos con y sin suero al 50%.

Nombre del péptido interferidor	CIM	CIM en presencia de FBS al 50%
C30	6 µg/ml	50 µg/ml
Hit1	3 µg/ml	25 µg/ml
Hit50	25 µg/ml	100 µg/ml
Hit57A	50 µg/ml	100 µg/ml

Para detectar los péptidos en suero, se usó un ensayo de transferencia por puntos. Los péptidos también se diluyeron en PBS, se transfirieron y se usaron como guía de cuantificación. Partiendo de 100 µg/ml, se transfirieron los puntos sobre una membrana de nitrocelulosa después de diluciones de factor 2 del péptido.

Ya que el péptido se marcó con biotina, para el sondado se usó estreptavidina-HRP. Hubo una respuesta lineal, lo que sugiere que este método tiene éxito para la detección en suero en un intervalo entre 300 $\mu\text{g/ml}$ y 6 $\mu\text{g/ml}$ (figura 30). Para más información acerca de la detección de péptidos, véase el ejemplo 4.

5 2.11 Evaluación preliminar de la toxicidad *in vivo* de interferidores antibacterianos en ratas y ratones

Para evaluar la toxicidad de los péptidos interferidores antibacterianos *in vivo*, se inyectó a ocho ratas Fisher macho libres de gérmenes que pesaban aproximadamente ± 350 el péptido interferidor C30 en tampón A: histidina-acetato (pH 6,5) y tampón B: tampón fosfato (pH 6,5). Se inyectó a dos ratas una concentración de 1,5mg/kg y a dos una concentración de 3mg/kg. Estas fueron inyecciones únicas no repetibles en la vena caudal. Se observó a las ratas durante varios días pero no hubo evidencias aparentes de mortalidad u otros efectos secundarios.

Además, se inyectó a tres grupos de ratones Swiss hembra de 6 semanas de edad dosis crecientes de C30 a lo largo de un periodo de 1 semana. C30 se disolvió en agua fisiológica y se administró 1 inyección al día. En los primeros 3 días se administraron inyecciones en la vena caudal (150 μl por inyección) y durante los 2 días siguientes inyecciones IP (300 μl por inyección). La dosis primaria comenzó por 3mg/kg y se aumentó la dosis gradualmente cada día. El grupo de control recibió el mismo volumen de suero salino. La dosis más alta analizada para las inyecciones IV fue de 50mg/kg y para las inyecciones IP de 100mg/kg. Los ratones a los que se inyectó por vía IV no mostraron signos de mortalidad ni cualquier otro efecto secundario visible. Sin embargo, los ratones a los que se inyectó por vía IP desarrollaron una lesión subcutánea en forma de bulto después de la dosis más alta de 100mg/kg, lo que sugiere que la solución de péptido era demasiado densa y formó agregados insolubles. Los órganos de los ratones tratados y de control se sometieron a un análisis histológico adicional. Después de administrar las 5 inyecciones, se extrajo sangre mediante punción retro-orbital y se analizó. No se observaron anomalías en la sangre.

25 2.12 Eficacia *in vivo* del compuesto C30 Animales:

Para todos los estudios, se usaron ratones Swiss NIH hembra libres de patógenos específicos de seis semanas de edad (Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN) con un peso de 21 a 24 g. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético local de Experimentos en Animales.

30 **Modelo de muslo neutropénico de ratón de cepa MRSA 326 de *S. aureus*.**

Se hicieron neutropénicos los ratones inyectando ciclofosfamida (Sigma) por vía intraperitoneal 4 días (150 mg/kg de peso corporal) y 1 día (100 mg/kg) antes de la infección experimental. Los estudios previos han demostrado que este régimen produce neutropenia en este modelo durante 5 días. Se cultivaron cultivos de caldo de *S. aureus* MRSA 326 recién sembradas durante una noche en caldo Mueller-Hinton (MHB). Después de una dilución 1:4.000 en PBS, los recuentos bacterianos del inóculo variaron entre 10^6 y 2×10^6 UFC/ml. Se anestesió brevemente a los ratones con isoflurano aproximadamente al 4% justo antes de la inoculación. La suspensión bacteriana (0,05 ml) se inyectó por vía intramuscular en cada muslo (aproximadamente 5×10^4 UFC). El tratamiento se inició 2 h después de la inoculación bacteriana por vía i.v. (intravenosa) o i.p. (intraperitoneal). En este estudio, se usaron cuatro grupos de 3 animales por grupo:

- el grupo A recibió solo tampón y se sacrificó 4 h después de la infección,
- 45 • el grupo B se trató por vía i.v. con 15mg/kg de C30 (volumen total de 150 μl) y se le sacrificó 4 horas después de la infección,
- el grupo C recibió dos inyecciones i.p. de 30mg/kg después de 2 horas y 4 horas después de la infección y se le sacrificó 6 horas después de la infección.
- 50 • al grupo D se le inyectó por vía i.v. con 15mg/kg de vancomicina y se le sacrificó 4 horas después de la inyección.

En varios puntos de tiempo después del tratamiento, se sacrificó compasivamente a grupos de tres ratones mediante asfixia con CO_2 . Se homogeneizó el músculo del muslo y se diluyó decimalmente en PBS helado y se sembraron alícuotas de 10 μl de cinco diluciones seriadas en sangre agar (en 3 repeticiones de dilución independientes por homogeneizado de muslo). Después de incubar durante una noche a 37°C , se numeraron las UFC para cada muslo y se expresaron como el \log_{10} UFC/muslo.

60 Tal como se muestra en la figura 31, se demostró que el compuesto C30 redujo la expansión del inóculo inicial en $6,9 \log_{10}$ UFC/ml cuando se le inyectó una dosis i.v. embolada de 15 mg/kg. En comparación, la misma dosis de vancomicina redujo el crecimiento en $8,7 \log_{10}$ UFC/ml. Una doble dosis intraperitoneal de C30 no mostró un rápido efecto en la reducción de las UFC en el muslo (lo que de hecho es de esperar dada la vía de administración). Se necesita una evaluación de dependencia de tiempo adicional de esta vía de administración. Asimismo, el experimento carece de un grupo de control de animales sacrificados a las 6 horas después de la infección. Sin embargo, teniendo en cuenta que las bacterias se expandieron hasta $4,7 \log_{10}$ UFC/ml 4 horas después de la

inoculación en ratones no tratados (1,7 veces) se podría argüir que a las 6 horas después de la infección, debería aumentar logarítmicamente de manera adicional la cantidad de UFC. Por este motivo, aún no debería descartarse el suministro i.p.

5 3. Aplicaciones antivíricas

El brote de enfermedad provocado por la gripe estacional, el brote pandémico de 2009 de H1N1 y la diseminación aumentada de virus de la gripe resistentes a fármacos (adamantanos e inhibidores de neuraminidasa) demuestran que existe una necesidad médica de nuevos fármacos que puedan inhibir muchos tipos o variantes de los virus de la gripe y sean menos sensibles a la variabilidad estacional del virus. En la actualidad, Tamiflu® de Roche y Relenza® de GSK son los fármacos prescritos con más frecuencia para el tratamiento de la gripe. Ambos fármacos actúan de manera selectiva sobre la proteína neuraminidasa. Los virus de gripe circulantes están desarrollando rápidamente resistencia contra el Tamiflu® y en la actualidad hay un número muy limitado de fármacos antigripales en desarrollo clínico.

Por lo tanto, se decidió diseñar interferidores contra regiones conservadas de proteínas de la gripe, para asegurar una amplia especificidad de diana. De manera importante, el mecanismo de acción de la tecnología de interferidores es fundamentalmente diferente al de las vacunas dirigidas contra enfermedades infecciosas y todas las demás estrategias de intervención antivíricas usadas en la actualidad, es decir, se dirige al proceso elemental del plegamiento de proteínas y por lo tanto, representa una intervención molecular completamente nueva y de presión de selección en la capacidad vírica. Además, permite la identificación de nuevas dianas víricas que hasta ahora no eran susceptibles a la inhibición. Además, ya que los interferidores antivíricos muestran un comportamiento de alta estabilidad, el suministro de los interferidores mediante pulverizadores o aerosoles intranasales o intratraqueales podría ser posible para administración local en el sitio de infección y por lo tanto, pueden revelar una ventaja adicional de los interferidores en comparación con los fármacos prescritos en la actualidad.

Para el diseño de los interferidores, se prestó especial atención a las subunidades de polimerasa vírica (PA, PB1, PB2) y en nucleoproteína (NP). Estas proteínas están altamente conservadas y la última proteína vírica se identificó recientemente como una diana para un compuesto de molécula pequeña que ejerce su efecto antivírico desencadenando la agregación de NP, aunque existen virus de la gripe que son naturalmente resistentes contra este fármaco experimental (Kao et al., Nat Biotechnol. 2010; 28(6):600-5). En resumen, los interferidores que se dirigen a estas proteínas conservadas podrían proporcionar una respuesta a la creciente resistencia de los virus de la gripe contra antivíricos disponibles en la actualidad.

En un experimento preliminar se evaluó un panel de 36 péptidos dirigidos contra diferentes proteínas del virus de la gripe A. Se cultivaron hasta la confluencia células de riñón canino Madin Darby (MDCK) y se preincubaron durante 1 hora a 37°C con interferidores en medio asérico. Después, se infectó a las células durante 16 horas con virus NIBRG-14 (una cepa de H5N1) o PR8 (una cepa de H1N1). Se seleccionaron los péptidos más prometedores para cada una de las proteínas seleccionadas para su evaluación adicional. Estos péptidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Secuencias de interferidores antivíricos seleccionados para evaluación adicional

N.º de interferidor	Secuencia del péptido interferidor	Proteína diana	Secuencia idéntica en la proteína diana
1	O Z RLIQLIVSRGSRLIQLIVSR (SEQ ID NO: 116)	PB2	R LIQLIVS (SEQ ID NO: 120)
2	O Z RTTIM AAFRG SRTTIMAAFR (SEQ ID NO: 117)	NP	TTIMAAF (SEQ ID NO: 121)
3	O Z RTMAWTVVRGSRTMAWTVVR (SEQ ID NO: 118)	PA	TMAWTVV (SEQ ID NO: 122)
4	O Z RGV SILNLRGSRGV SILNLR (SEQ ID NO: 119)	PB1	GV SILNL (SEQ ID NO: 123)

La O y la Z delante de la secuencia hacen referencia a un marcador óptico y a un enlazador, respectivamente. O representa 5(6)-carboxifluoresceína. El enlazador usado es el ácido N-(3-{2-[2-(3-amino-propoxi)-etoxi]-propil}-succinámico), en ocasiones también citado como ácido 4,7,10-trioxatridecan-succin(ám)ico o Ttds. Por lo tanto, la estructura de las moléculas corresponde a la fórmula:

Marcador - Z1-X1-Y1-X2-Z2-X3-Y2-X4, es decir, n=2, el marcador y Z1 son como se han definido anteriormente, los 4 restos X equivalen a un solo resto de R, Z2 es un enlazador GS, Y1=Y2 y es igual a la secuencia listada en la última columna de la tabla, salvo para el interferidor 1, donde el resto Y es LIQLIVS (SEQ ID NO: 124). Para esta región de agregación, el resto constitutivo N-terminal es igual al resto flanqueante en la proteína. Todas las regiones de agregación son únicas para la proteína de gripe A a la que se dirigen.

Como experimento de seguimiento, se cultivaron células MDCK en monocapas confluentes en un formato de 24 pocillos. Los interferidores (200 mg) se disolvieron en 45 microlitros de DMSO para obtener una solución madre 2

- mM. Se añadieron 7 microlitros de la solución madre del interferidor a 400 microlitros de PBS para obtener una solución 35 micromolar. Las células se lavaron con medio aséptico, tras lo cual se añadieron 250 microlitros de medio aséptico fresco y 100 microlitros de interferidor. Los interferidores se diluyeron de tal forma que se aplicaron a las células a concentraciones de 1 o 10 μ M. Posteriormente, las células se incubaron durante 4 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Después de 4 h de preincubación con los péptidos interferidores, se inoculó a las células con 10 unidades formadoras de placas (ufp) de virus PR8. Se retiró el inóculo y se añadió medio que contenía tripsina. Se tomaron muestras a las 0, 8, 12, 16, 24 y 36 horas para la cuantificación del virus. Como control positivo, se trató a las células con 1 μ M o 10 nM de Tamiflu. En la figura 32 se muestran los resultados de experimentos duplicados.
- 10 Tal como puede verse a partir de la figura, a 10 μ M todos los péptidos inhiben la replicación del virus. A 1 μ M, los interferidores 1 y 4 siguen inhibiendo de manera reproducible la replicación vírica, mientras que el efecto de los interferidores 2 y 3 es menos fuerte. Obsérvese, sin embargo, que el tamiflu tampoco inhibió completamente la replicación vírica en una situación.
- 15 También se usó un ensayo de minireplicón de gripe A más sensible para evaluar el potencial de los interferidores candidatos. Este sistema requiere la presencia de las proteínas PA, PB1, PB2 y NP funcionales. Como indicador, se usó una construcción antisentido de luciferasa de luciérnaga, que se transfectó en células de mamífero junto con plásmidos de expresión para PB1, PB2, PA y NP. La normalización para la transfección se llevó a cabo usando un indicador de luciferasa de renilla. Un experimento de control confirmó que el minirreplícón de luciferasa de luciérnaga produjo actividad de luciferasa cuando estaban presentes los 4 componentes, pero no cuando faltaba uno de ellos o cuando se cotransfectó un vector de expresión que codifica la proteína Mx1 de ratón, que confiere resistencia selectiva al virus de la gripe inhibiendo la síntesis de ARNm vírico en el núcleo de células infectadas por el virus de la gripe (fig. 33).
- 25 Usando como lectura este sistema, se pudo confirmar la actividad antivírica de las construcciones de interferidor. También se probaron variaciones de estos interferidores con diferentes restos constitutivos (R o D) y/o diferentes restos enlazadores Z₂ (GS, PP o PS), al igual que interferidores con otras secuencias de agregación (véase la figura 34). Las secuencias de estas construcciones se muestran en la tabla 11.

30 Tabla 11. Secuencias de interferidores adicionales dirigidos contra proteínas víricas.

Interferidor	Secuencia del péptido interferidor	Proteína diana	Secuencia idéntica en la proteína diana
PA-1	O Z RTMAWTVVGRSRTMAWTVVR (=n.º 3 en la tabla 10) (SEQ ID NO: 118)	PA	TMAWTVV (SEQ ID NO: 122)
	O Z RTMAWTVVRPPRTMAWTVVR (SEQ ID NO: 125)		
	O Z DTMAWTVVDPPDTMAWTVVD (SEQ ID NO: 126)		
	O Z RTMAWTVVRPSRTMAWTVVR (SEQ ID NO: 127)		
PA-2	O Z DVHIYYLDPPDVHIYYLD (SEQ ID NO: 128)	PA	VHIYYL (SEQ ID NO: 164)
	O Z RVHIYYLRPSRVHIYYLR (SEQ ID NO: 129)		
PA-3	O Z DNLYGFIIIDPPDNLYGFIIID (SEQ ID NO: 130)	PA	NLYGFII (SEQ ID NO: 165)
	O Z RNLYGFIIIRPSRNLYGFIIIR (SEQ ID NO: 131)		
PB1-1	O Z RGVSILNLRPPRGVSILNLR (SEQ ID NO: 132)	PB1	GVSILNL (SEQ ID NO: 123)
	O Z DGVSILNLDPPDGVSILNLD (SEQ ID NO: 133)		
	O Z RGVSILNLRPSRGVSILNLR (SEQ ID NO: 134)		
PB1-2	O Z RGFVYFVRPPRGFVYFVR (SEQ ID NO: 135)	PB1	R GFVYFV (SEQ ID NO: 166)
	O Z DGFVYFVDPPDGFVYFVD (SEQ ID NO: 136)		
PB1-3	O Z RMALQLFIRPPRMALQLFIR (SEQ ID NO: 137)	PB1	MALQLFI (SEQ ID NO: 167)
	O Z DMALQLFIDPPDMALQLFID (SEQ ID NO: 138)		
PB2-1	O Z RLIQLIVSRGSRLIQLIVSR (=n.º 1 en la tabla 10) (SEQ ID NO: 116)	PB2	R LIQLIVS (SEQ ID NO: 120)
	O Z RLIQLIVSRPPRLIQLIVSR (SEQ ID NO: 139)		
	O Z DLIQLIVSDPPDLIQLIVSD (SEQ ID NO: 140)		
	O Z RLIQLIVSRPSRLIQLIVSR (SEQ ID NO: 141)		
PB2-2	O Z RLAVTWWNRPPRLAVTWWNR (SEQ ID NO: 142)	PB2	LAVTWWN R (SEQ ID NO: 168)

Interferidor	Secuencia del péptido interferidor	Proteína diana	Secuencia idéntica en la proteína diana
	O Z DLAVTWWNDPPDLAVTWWND (SEQ ID NO: 143)		
PB2-3	O Z RQSLIIAARPPRQSLIIAAR (SEQ ID NO: 144)	PB2	R QSLIIA R (SEQ ID NO: 169)
	O Z DQSLIIAADPPDQSLIIAAD (SEQ ID NO: 145)		
PB2-4	O Z RGFLILGRPPRGFLILGR (SEQ ID NO: 146)	PB2	GFLILG R (SEQ ID NO: 170)
	O Z DGFLILGDPPDGFLILGD (SEQ ID NO: 147)		
	O Z RGFLILGRPSRGFLILGR (SEQ ID NO: 148)		
PB2-5	O Z DLMVAYMLDPPDLMVAYMLD (SEQ ID NO: 149)	PB2	LMVAYML (SEQ ID NO: 171)
NP-1	O Z RTTIMAAFRGSRRTTIMAAFR (=n.º 2 en la tabla 10) (SEQ ID NO: 117)	NP	TTIMAAF (SEQ ID NO: 121)
	O Z RTTIMAAFRPPRTTIMAAFR (SEQ ID NO: 150)		
	O Z DTTIMAAFDPPDTTIMAAFD (SEQ ID NO: 151)		
	O Z RTTIMAAFRPSRRTTIMAAFR (SEQ ID NO: 152)		
NP-2	O Z RLVWMACHRPPRLVWMACHR (SEQ ID NO: 153)	NP	LVWMACH (SEQ ID NO: 172)
	O Z DLVWMACHDPPDLVWMACHD (SEQ ID NO: 154)		
	O Z RLVWMACHRPSRLVWMACHR (SEQ ID NO: 155)		
M1-A	O Z RVAFGLVCRPPRVAFGLVCR (SEQ ID NO: 156)	M1	VAFGLVC (SEQ ID NO: 173)
	O Z DVAFGLVCDPPDVAFGLVCD (SEQ ID NO: 157)		
	O Z RVAFGLVCRPSRVAFGLVCR (SEQ ID NO: 158)		
M1-B	O Z RLGfVFTLRPPRLGfVFTLR (SEQ ID NO: 159)	M1	LGfVFTL (SEQ ID NO: 174)
	O Z DLGfVFTLDPPDLGfVFTLD (SEQ ID NO: 160)		
	O Z RLGfVFTLRPSRLGfVFTLR (SEQ ID NO: 161)		
NS1-C	O Z RAVGVLIGRPPRAVGVLIGR (SEQ ID NO: 162)	NS1	AVGVLIG (SEQ ID NO: 67)
	O Z DAVGVLIGDPPDAVGVLIGD (SEQ ID NO: 66)		
	O Z RAVGVLIGRPSRAVGVLIGR (SEQ ID NO: 163)		
O y Z son marcadores y enlazadores idénticos a los especificados para la tabla 10 anterior.			

Como control, también se probaron interferidores diseñados contra proteínas víricas internas (M1 y NS1) que no estaban implicadas en el ensayo de minirreplícón y estos, de hecho, no mostraron reducción en la actividad de luciferasa (fig. 35). El diseño de estos interferidores irrelevantes es idéntico al de los 4 interferidores contra las proteínas polimerasas y contra NP, con restos constitutivos y enlazadores Z₂ (es decir, enlazadores internos, la fórmula en este caso es Z₁-X₁-Y₁-X₂-Z₂-X₃-Y₂-X₄) tal como se indica en la figura. En la tabla 11 también se muestran la secuencia agregante y secuencias peptídicas para péptidos contra la proteína de matriz 1 y la proteína no estructural 1.

- 5
- 10 Por lo tanto, los péptidos interferidores pueden diseñarse contra cada una de las proteínas polimerasas del virus de la gripe, así como contra nucleoproteínas. Estos interferidores tienen éxito en reducir la replicación del ARN de la gripe, un efecto que es específico y dependiente de la regulación a la baja de la diana, ya que los interferidores contra dianas no relevantes no dieron como resultado la consecución de la regulación a la baja.

15 **4. Detección y diagnóstico**

4.1 Detección de β-galactosidasa (β-gal) con interferidores específicos

4.1.1 Diseño y síntesis de péptidos interferidores específicos

- 20 Los segmentos de agregación-nucleación de la diana que iba a detectarse, es decir, β-galactosidasa, se detectaron usando el algoritmo Tango, un algoritmo estadístico-mecánico para predecir regiones propensas a la β-agregación

en proteínas basándose en tres parámetros fisicoquímicos, a saber, baja carga neta, alta hidrofobia y propensión a formar β -láminas. Posteriormente, estas se verificaron respecto de los requisitos para los restos Y_i indicados en la solicitud, para asegurarse de que estas secuencias poseen una alta propensión a la agregación. Tango compara la propensión de una secuencia de aminoácidos dada contra un conjunto de secuencias similares a formar diversos elementos estructurales secundarios y asigna una puntuación (0-100) proporcional a su capacidad para formar agregados de β -lámina. Se considera que una serie de secuencia con una puntuación total <5 tiene una baja propensión a la agregación y aquellas con > 50 como fuertemente agregantes. A partir de la secuencia de proteína de β -gal (representada en la SEQ ID NO: 3, sin el resto iniciador de M), se seleccionaron dos series de secuencias de aminoácidos con una puntuación total de tango >50 , es decir, los restos 7 a 12 en la SEQ ID NO: 3 (LAVVLQ (SEQ ID NO: 75, Tango 1) y los restos 453 a 460 en la SEQ ID NO: 3 (VIIWSLGN (SEQ ID NO: 76), Tango 2) y se sintetizó una colección de péptidos de alta pureza ($>95\%$) que comprendían la secuencia de tipo silvestre flanqueada por uno o más restos constitutivos (Arg, Lys, Asp, Glu y Pro) mediante síntesis en fase sólida. Como control negativo, se seleccionó una serie de secuencia que comprende los restos 106 a 113 de la SEQ ID NO: 3 que muestra una puntuación total de Tango < 5 para establecer la baja propensión a la agregación de este segmento, tal como se predijo mediante el algoritmo Tango. Además, se sintetizaron tres versiones de interferidor mutantes que comprendían VIIWSLGN (SEQ ID NO: 76) (región Tango 2). Las secuencias de los 6 péptidos interferidores (que comprenden las regiones Tango identificadas, que comprenden la secuencia de control negativo o que comprenden la región 2 de Tango variante (o mutada)) se representan en la tabla 12. El extremo C-terminal de estos 6 péptidos se acetilaron y marcaron con marcador de biotina o polihistidina ($(His)_6$) en el extremo N-terminal para su detección por transferencia de Western (WB) y su selección *in vitro*, respectivamente (véase el ejemplo 2).

SEQ ID NO: 3, secuencia de aminoácidos de β -galactosidasa. Las regiones de Tango identificadas se representan en negrita

1 TMITDSLAV **VLQRRD**WENP GVTQLNRLAA HPPFASWRNS EEARTDRPSQ QLRSLNGEWR

60 FAWFPAPEAV PESWLECDLP DADTVVPSN WQMHGYPDPI YTNVTYPITV NPPFVPAENP

25 120 TGCYSLTFNI DESWLQEGQT RIIFDGVNSA FHLWCNGRWV GYGQDSRLPS EFDLSAFLRA

ES 2 679 995 T3

180 GENRLAVMVL RWS DGSYLED QDMWRMSGIF RDVSL LHKPT TQISDFQVTT LFNDDFSRAV
 240 LEAEVQMYGE LRDEL RVTVS LWQGETQVAS GTAPFGGEII DERGGYADRV TRLN VENPE
 300 LWSAEIPNLY RAVVELHTAD GTLIEAEACD VGFREVRIEN GLLLLNGKPL LIRGVNRHEH
 360 HPLHGQVMDE QTMVQDILLM KQNNFNAVRC SHYPNHPLWY TLCDRYGLYV VDEANIETHG
 420 MVPMNRLTDD PRWLPAMSER VTRMVQRDRN HPSV**IIW**SLG NESGHGANHD ALYRWIKSV D
 480 PSRPVQYEGG GADTTATDII CPMYARVDED QPFPVAVPKWS IKKWLSLPGE MRPLILCEYA
 540 HAMGNLSGGF AKYWQAFRQY PRLQGGFVWD WVDQSLIKYD ENGNPWSAYG GDFGDTPNDR
 600 QFCMNGLVFA DRTPHPALTE AKHQQQYFQF RLSGRTIEVT SEYLFRRHSDN EFLHWMVALD
 660 GKPLASGEVP LDVGPQ GKQL IELPELPQPE SAGQLWLTVR VVQPNATAWS EAGHISAWQQ
 720 WRLAENLSVT LPSASHAIPQ LTTS GTDFCI ELGNKRWQFN RQSGFLSQMW IGDEKQLLTP
 780 LRDQFTRAPL DNDIGVSEAT RIDPNAWVER WKAAGHYQAE AALLQCTADT LADAVLITTA
 840 HAWQHQGKTL FISRKTYRID GHGEMVINVD VAVASDTPHP ARIGLTCQLA QVSERVNWLG
 900 LGPQENYPDR LTAACFDRWD LPLSDMYTPY VFPS ENGLRC GTRELNYGPH QWRGDFQFNI
 960 SRYSQQLME TSHRHLLHAE EGTWLNIDGF HMGIGGDDSW SPSVSAEFQL SAGRYHYQLV
 1020 WCQK

Tabla 12: Lista de los 6 péptidos interferidores diferentes usados para la detección de β -Gal en lisado celular completo de *E. coli* BL21.

Péptidos interferidores	Secuencia de interferidor [#]	Secuencia de tipo silvestre [^]
Tango 1	<i>b</i> ~ RLAVVLQR (SEQ ID NO: 44)	DSLAVVLQRR (SEQ ID NO: 50)
Tango 2	<i>b</i> ~ RVIIWSLG NR (SEQ ID NO: 45)	PSV IIW SLGNES (SEQ ID NO: 51)
Fuera de la diana	<i>b</i> ~ RPITVNPPFR (SEQ ID NO: 46)	TY PITV NPPFVP (SEQ ID NO: 52)
Tango 2 Mut_1	<i>b</i> ~ RVPIWSLG NR (SEQ ID NO: 47)	PSV IIW SLGNES (SEQ ID NO: 51)
Tango 2 Mut_2	<i>b</i> ~ RVIPWSLG NR (SEQ ID NO: 48)	PSV IIW SLGNES (SEQ ID NO: 51)
Tango 2 Mut_3	<i>b</i> ~ RVIPESLGNR (SEQ ID NO: 49)	PSV IIW SLGNES (SEQ ID NO: 51)
# La anotación <i>b</i> ~ tal como se usa en el presente documento, indica que el péptido está biotinilado en N-terminal y fusionado a un enlazador. [#] Las secuencias de tipo silvestre se muestran con sus restos flanqueantes naturales.		

5 Los nombres de los interferidores, tal como se usan en la explicación de los ejemplos siguientes, se representan en la columna 1, las secuencias se representan en la columna 2. En estas moléculas interferidoras, n es 1, X₁ y X₂ son restos de R, Y₁ es una serie de 6 ("Tango 1") u 8 ("Tango 2") restos de la proteína diana, Z. es un enlazador de aminoácidos N-terminal APAA (SEQ ID NO: 77) y las moléculas están fusionadas a un marcador detectable - en este caso, biotina (*b*). Para experimentos adicionales, también se han usado otros enlazadores, tales como Ttds y PEG, así como diferentes marcadores, tales como marcador de HA (YPYDVDPDYA (SEQ ID NO: 108)), marcador Flag (DYKDDDDK (SEQ ID NO: 106)) y marcador His (polihistidina) - se muestran experimentos representativos. Los péptidos mutantes comprenden una región Y1 con 1 o 2 sustituciones no conservativas en relación con la secuencia de la proteína diana, β -gal.

10

En la figura 36 se muestra una descripción esquemática del método de detección general de proteínas mediante el uso de interferidores, al que en lo sucesivo se hace referencia como PepBlot.

4.1.2. Detección de β -galactosidasa mediante transferencia de Western y análisis PepBlot con interferidores específicos para β -galactosidasa

La β -galactosidasa se expresó en primer lugar en *E. coli*. Para esto, se cultivaron células *E. coli* BL21 con la construcción de expresión pBad_ β gal_WT (vector pBad obtenido de Invitrogen) en medio LB a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600\text{ nm}} \sim 0,6$, se indujeron las células con arabinosa al 0,2% y se las dejó crecer durante una noche a 37°C. En paralelo, se cultivaron células BL21 que no expresaban β -gal para experimentos de control y valoración.

Se centrifugó una suspensión de 0,4 ml de células BL21 ($DO_{600\text{ nm}} \sim 1,2$) que expresaban β -Gal (cultivadas en condiciones inducidas) a 5000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 0,8 ml de reactivo de extracción de proteínas bacterianas (B-PER, Thermo Scientific) que contenía inhibidor de proteasa al sedimento bacteriano y se mezcló vorticialmente durante 30 s para lisar las células. A 21 μ l del lisado completo de células BL21 se le añadieron 5 μ l de tampón de carga de muestra de 5x SDS (Fermentas) y se calentó a 99°C durante 3 min. Esta mezcla (26 μ l por pocillo) se cargó en un gel de 10 pocillos NuPage con Bis-Tris al 4-12% y las proteínas se separaron en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon durante una noche con BSA al 1% en suero salino tamponado con fosfato, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4 (PBS-T) a 4°C. Cada carril de la membrana se cortó y se incubó por separado con anticuerpo de conejo anti- β -Gal, Tango 1 biotinilado, Tango 2 biotinilado o el péptido fuera de la diana biotinilado o un péptido Tango 2 mutante biotinilado.

El procedimiento seguido para la detección por transferencia de Western (WB) de β -gal con anticuerpo anti- β -Gal fue el siguiente. Se cortó el primer carril de la membrana y se incubó con anticuerpo policlonal de conejo anti- β -Gal (dilución 1:1000) durante 1 h con agitación suave en PBS-T. Esto fue seguido por lavados de 3x 10 min con PBS-T. Después del lavado final, se incubó la membrana con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP, dilución 1:5000) durante 1 h en PBS-T. Después, se lavó este carril de la membrana con PBS-T 3x 10 min y finalmente se enjuagó en agua desionizada durante 10 min. El carril de la membrana se expuso a reactivo de sustrato de HRP de quimioluminiscencia (Sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto, Thermo Fischer Scientific) y la proteína diana se visualizó usando el sistema de obtención de imágenes Chemi-Doc XRS de Bio-Rad (véase la figura 37, carril 1).

El procedimiento para la detección PepBlot (es decir, un protocolo similar a la transferencia de Western, pero con interferidores en lugar de anticuerpo como agente de detección) de β -gal con péptidos interferidores biotinilados fue del siguiente modo. Se preparó una solución madre (10 μ M) de cada uno de los péptidos biotinilados (Tango 1, Tango 2, fuera de la diana y mutantes de tango 2 (véase la tabla 12) en DMSO al 100%. La solución madre del péptido se diluyó (1/40) en tampón MES 10 mM, Trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,02%, pH 5,5 para obtener una concentración final del péptido de 250 nM. La solución de péptido recién preparada se añadió inmediatamente a la tira de membrana y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 1 h, se decantó la solución de péptido y la tira de membrana se lavó 4x 10 min con tampón MES 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,5. Después, se incubó la tira de membrana con reactivo de afinidad de biotina (dilución 1:100.000) de estreptavidina (SRP) conjugada a HRP en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Esto fue seguido de un lavado de 3x 10 min con PBS-T y finalmente se enjuagó en agua desionizada durante 10 min. La tira de membrana se expuso a reactivo de sustrato de HRP de quimioluminiscencia (Sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific) y la proteína diana se visualizó usando el sistema de obtención de imágenes Bio-Rad ChemiDoc XRS.

4.1.2.1 Selectividad de los diferentes interferidores usados

En la figura 37 se muestra una comparación de la detección por WB de β -gal procedentes de lisados celulares bacterianos completos usando anticuerpo policlonal de conejo anti- β -Gal y también la detección usando PepBlot con tres interferidores diferentes: Péptido Tango 1 (*b*~RLAWLQR (SEQ ID NO:44)) y péptido Tango 2 (*b*~RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 45)) y un péptido fuera de la diana (*b*~RPITVNPFFR (SEQ ID NO: 46)). Asimismo, en este caso, se usó biotina como marcador y APAA (SEQ ID NO: 77) como enlazador de aminoácidos. Se observó (véase la figura 37) que los interferidores Tango 1 y Tango 2 se unen a β -gal con alta especificidad. Aunque se ha predicho que el péptido Tango 1 muestra la mayor propensión a agregarse con β -gal, muestra una unión más débil (véase el carril 2) que el péptido interferidor Tango 2. Sin quedar ligados a un mecanismo de acción particular, una explicación es que el péptido Tango 1 interactúa de manera menos eficaz con el extremo N-terminal de la β -gal debido a que este extremo N-terminal se encuentra menos disponible en el estado inmovilizado de β -gal sobre la tira de membrana. Esta explicación no limitante está apoyada además por el hecho de que la adición del mismo péptido interferidor (es decir, el péptido Tango 1) a β -gal libre *in vitro* da como resultado una cinética de agregación más rápida en comparación con el péptido Tango 2 (véase más adelante). la figura 37 muestra claramente que el péptido Tango 2 presenta una fuerte afinidad por la β -Gal con una señal comparable a la detección con un anticuerpo específico para β -gal (compárense el carril 1 y el carril 3). Aunque el péptido interferidor fuera de la diana está poblado por aminoácidos hidrofóbicos, la presencia de más de un resto de P rompedor de β -lámina en el centro de la secuencia

detiene de manera eficaz la β -agregación. La banda en el carril 4 en la posición de ~20 kDa no es un efecto de la reactividad cruzada del péptido sino causada por la unión no específica de estreptavidina (SRP) en ausencia (o baja disponibilidad) de biotina. Los experimentos descritos en las siguientes secciones estarán basados principalmente en la secuencia de Tango 2.

5

4.1.2.2 Especificidad de la unión de sondas interferidoras

Para evaluar la especificidad de la interacción del péptido interferidor Tango 2 con β -gal, se llevaron a cabo experimentos de detección usando péptidos adicionales. En primer lugar, se sondó la β -Gal con un péptido de β -Gal no agregante pero hidrofóbico ($P_{106}ITVNPPF_{113}$) y no se observó interacción con el péptido sonda correspondiente b -RPITVNPPFR (SEQ ID NO: 46) con la β -Gal (véase lo anterior, Fig. 37, carril 4). En segundo lugar, se emplearon cuatro péptidos sonda cuyas secuencias corresponden a regiones de agregación identificadas usando TANGO en proteínas bacterianas y humanas no relacionadas. Esto se efectuó usando péptidos marcados con biotina procedentes del inhibidor B de cinasa 4 dependiente de ciclina humano (secuencia b -FLDTLWLHRA (SEQ ID NO: 175)), el antígeno específico de próstata (PSA, secuencia b -RQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 85)) y prolina deshidrogenasa (PD, b -RFFIALSR (SEQ ID NO: 176)) y ClpB ATPasa (b -RILLGUR (SEQ ID NO: 177)), ambos tomados de *Staphylococcus epidermidis*. El diseño de estas tres últimas sondas corresponde a moléculas con $n=1$, $X_1=X_2=$ un resto de Arg, con la secuencia Y_1 entre medias. En la primera sonda, FLD y RA son secuencias flanqueantes naturales del resto TLVVLH (SEQ ID NO: 178) que corresponde a Y_1 . En estas secuencias flanqueantes, D corresponde al resto constitutivo X_1 , R al resto constitutivo X_2 .

Todos estos péptidos fracasaron a la hora de proporcionar una tinción específica de la banda correspondiente a β -Gal (datos no mostrados), lo que demuestra que es necesaria la propensión a la agregación pero no es suficiente para una interacción específica. Finalmente, para probar si las regiones con alta puntuación de Tango toleraban la sustitución con otros restos y mantener sus propiedades, se generaron mutantes. En el primer caso, el resto de "I" se reemplazó por el resto de "P" rompedor de la β -lámina y se generaron 2 péptidos mutantes diferentes con un cambio de "I" a "P" (véase la tabla 12 para las secuencias específicas). Además, se usó el efecto de un péptido doble mutante que reemplaza "IW" por "PE" para estudiar la influencia del resto constitutivo cargado en la propensión a la β -agregación. Se espera que se suprima la agregación mediante la introducción de una carga repulsiva. El análisis PepBlot de los dos péptidos mutantes en un solo punto (b -RVPIWVSLGUR (SEQ ID NO: 47) y b -RVIPWVSLGUR (SEQ ID NO: 48)) ilustrado en la figura 38 muestra que estos péptidos mutantes siguen uniéndose de manera eficaz a β -Gal. Sin embargo, es evidente que mediante la introducción de sustituciones puede observarse unión fuera de la diana. Esto no es ilógico, ya que el resto de la serie inductora de la agregación corta no es único para la proteína β -Gal en *E. coli*. Además, la introducción adicional de un resto cargado da lugar a una pérdida prácticamente completa de la interacción. Esto demuestra la alta especificidad de secuencia de la unión de la sonda, ya que es suficiente una sola mutación puntual para suprimir la especificidad de unión, mientras que es suficiente la supresión de la propensión a la agregación para anular totalmente la unión, a pesar de su 80% de identidad de secuencia. Estos datos confirman la hipótesis de que la propensión a la agregación y la coincidencia de secuencia sean requisitos previos para la especificidad de la interacción mediada por péptidos y concuerdan con un estudio reciente (Sabate, R., et al. J. Mol. Biol. 404: 337-352, 2010) que demuestra que las versiones desordenadas o invertidas del polipéptido amiloide de islote no forma una siembra cruzada entre sí con la secuencia de tipo silvestre, lo que confirma la dependencia de la posición más allá de la composición de secuencia.

4.1.2.3 Cinética de los interferidores en la unión

Para estudiar la cinética del péptido interferidor Tango 2 a β -Gal (es decir, el tiempo de contacto entre el interferidor y la diana) en lisado celular completo de BL21, se incubó el péptido con la membrana desde 30 s hasta 1 h. Se retiró la membrana del tampón de incubación a intervalos de tiempo selectivos y se procesó adicionalmente como se ha descrito anteriormente.

La figura 39 ilustra que la detección de β -Gal a partir de lisado celular bacteriano completo de BL21 puede lograrse en un breve espacio de tiempo (tan bajo como 30 segundos) de incubación con el péptido.

4.1.2.4 Sensibilidad del método de detección PepBlot basado en el uso de interferidores

Se determinó la sensibilidad del péptido interferidor basándose en la detección PepBlot. Para esto, se añadió β -Gal en el intervalo de concentración de 0,1 pmol (11,6 ng) a 10 pmol (1160 ng) a un lisado celular completo de BL21 no inducido ($DO_{600\text{ nm}} \sim 0,6$). A 21 μ l del lisado completo de células BL21 se le añadieron 5 μ l de tampón de carga 5x SDS (Fermentas) y se calentó a 99°C durante 3 min. Se cargaron 26 μ l de esta mezcla que contenía diferentes concentraciones de β -Gal en un gel de 10 pocillos NuPage con Bis-Tris al 4-12% y las proteínas se separaron en condiciones desnaturizantes. Posteriormente, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon durante una noche con BSA al 1% en PBS-T a 4°C. Las incubaciones y el manejo con los interferidores fueron como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La figura 40 muestra el resultado de este experimento. A partir de estos datos, resulta evidente que pueden detectarse cantidades subpicomolares de β -Gal (tan bajas como 58 ng) (véase la detección de β -Gal en el carril 2 de la figura 40A), lo que es comparable al límite de detección de un anticuerpo. Además, la señal obtenida también es comparable a la

65

detección con anticuerpo anti- β -Gal (figura 41).

4.1.2.5 Especificidad de la detección PepBlot

- 5 Para determinar la influencia de los restos constitutivos en la especificidad de la detección PepBlot, se generaron péptidos interferidores contra la proteína diana β -gal con la secuencia Tango central "VIIWSLGN" (SEQ ID NO: 76). Para esto, se generaron 3 péptidos interferidores: 1) Sin resto constitutivo, con la secuencia VIIWSLGN (SEQ ID NO: 76) unida a un marcador Flag (DYKDDDDK (SEQ ID NO: 106)) en el extremo C-terminal mediante el enlazador de aminoácidos GSGS (VIIWSLGN GSGSDYKDDDDK (SEQ ID NO: 179)). 2) secuencia Tango flanqueada por restos constitutivos naturales (RDRNHPSVIIWSLGNESGHG (SEQ ID NO: 180)). 3) Restos constitutivos cargados complementarios con los restos "D" y "R" posicionados para complementar a los restos polares "S" y "E" (DVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 181)). Los primeros dos péptidos cumplen con las definiciones de péptidos interferidores proporcionadas en el documento WO2007/071789, mientras que el tercer péptido es una molécula interferidora de acuerdo con la definición estructural proporcionada en el presente documento. Todos los péptidos listados en la tabla 13 se biotinilaron por partida doble (tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal) y se unieron a los péptidos interferidores mediante un enlazador de Ttds.

Tabla 13: Lista de los 3 péptidos interferidores diferentes usados para estudiar la influencia de los restos constitutivos en la especificidad de la detección de β -gal en una plataforma de PepBlot competitiva.

Péptidos interferidores	Secuencias de interferidor [¶]	Secuencia natural
Sin resto constitutivo	<i>b</i> ~VIIWSLGN GSGSDYKDDDDK~ <i>b</i> (SEQ ID NO: 179)	RDRNHPSVIIWSLGNESGHG
Flancos naturales	<i>b</i> ~RDRNHPSVIIWSLGNESGHG~ <i>b</i> (SEQ ID NO: 180)	
Carga complementaria	<i>b</i> ~DVIIWSLGNR~ <i>b</i> (SEQ ID NO: 181)	

[¶] Los péptidos interferidores se unieron a biotina tanto en el extremo C-terminal (indicado por ~*b*) como en el extremo N-terminal (*b*~) con el enlazador Ttds. Obsérvese que la secuencia Tango está subrayada en cada péptido.

- 20 Se probó el rendimiento de los péptidos para unirse a β -gal en una plataforma PepBlot competitiva, donde se tomó suero clínico al 7% en un carril y β -gal en lisado completo de *E. coli* en el otro carril. Se preparó una solución madre (10 μ M) de cada uno de los péptidos biotinilados en DMSO al 100%. La solución madre del péptido se diluyó (1/400) en tampón MES 10 mM, Trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,5 para obtener una concentración final del péptido de 25 nM. La solución de péptido recién preparada se añadió inmediatamente a la tira de membrana y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 15 min, se decantó la solución de péptido y la tira de membrana se lavó 3x 10 min con tampón MES 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,5 y se procesó adicionalmente tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 30 La figura 42 muestra la influencia de los restos constitutivos en la especificidad del péptido interferidor basándose en la detección PepBlot. Los tres péptidos se unen a β -gal, pero por mucho, la mejor sonda fue el péptido interferidor con restos constitutivos cargados complementarios. Este péptido muestra una fuerte interacción con β -gal en comparación con los otros dos péptidos y no reacciona de manera cruzada con proteínas en el suero. La complementación de la carga, junto con la propensión a formar β -láminas de la secuencia de Tango contribuye a una asociación intermolecular favorable que parece ser altamente específica. Por otro lado, el péptido con los flancos naturales presenta una baja especificidad, lo que es evidente por las bandas específicas en el suero clínico. Los datos sugieren que no son absolutamente necesarios los restos constitutivos para la interacción del péptido interferidor con la proteína diana - tal como se mostró también en el documento WO2007/071789. Sin embargo, puede refinarse la detección para lograr una alta especificidad, diseñando péptidos con restos flanqueantes complementarios que pueden incluir aminoácidos polares tales como R, D, E, K, H y el rompedor de β -láminas, P.

4.2. Interacciones de interferidor-diana estudiadas con resonancia de plasmón superficial

- 45 En este experimento *in vitro*, se midió la afinidad de diferentes péptidos interferidores por la unión a β -gal mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Los experimentos de SPR se llevaron a cabo a 25°C usando un dispositivo Biacore T100 equipado con una placa sensora CM5 (GE Healthcare). Los reactivos de acoplamiento (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y etanolamina-HCl) se adquirieron de GE Healthcare. La BSA y la β -gal se adquirieron de Sigma-Aldrich y Roche Diagnostics, respectivamente. Los péptidos se sintetizaron en JPT, GmbH y tenían una pureza >95%. Las proteínas, BSA y β -gal se inmovilizaron, respectivamente, en los canales de referencia y de muestra sobre una placa sensora CM5 mediante química de acoplamiento de amina convencional a un caudal de 10 μ l min⁻¹. La superficie de carboximetil dextrano se activó mediante la inyección de EDC y NHS a una relación 1:1 durante 7 minutos. Las proteínas se diluyeron en tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 4,5 a una concentración final de 0,2 mg ml⁻¹ y se inyectaron en pulsos cortos sobre la superficie activada hasta que los niveles de inmovilización alcanzaron 4000 UR u 8000 UR, para BSA y β -Gal, respectivamente. Los grupos reactivos restantes se bloquearon con etanolamina 1 M, pH 8. Tras completar el

acoplamiento, se regeneró la superficie con pulsos breves de NaOH 50 mM y urea 8 M para eliminar las proteínas no unidas covalentemente. Los niveles de inmovilización tras la regeneración fueron normalmente de entre 3500 UR a 4000 UR en los canales tanto de referencia como de muestra. La afinidad de varios interferidores (véase la tabla 14 para las secuencias de los interferidores): Tango zona 1, Tango zona 2, fuera de la diana, mutantes de Tango zona 2 y la repetición en tándem de Tango zona 2 por la unión a β -Gal se investigó inyectando los péptidos marcados con hexahistidina a lo largo de las superficies de referencia (BSA) y de muestra (β -Gal) a 25°C. Los péptidos, disueltos en el tampón de ejecución (fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween 20 al 0,015%) a una concentración de 1 μ M, se inyectaron durante 60 s a un caudal de 30 μ l min⁻¹ y después se dejaron disociar durante 600 s. La inyección se repitió sobre la misma superficie así como en superficies inmovilizadas de manera independiente. La superficie se regeneró entre cada ciclo mediante pulsos de 30 s de i) NaOH 50 mM y ii) urea 8 M y se dejó estabilizar durante 400 s antes del ciclo siguiente.

Tabla 14: Secuencias de los diferentes péptidos interferidores usados en el análisis de SPR y cinética de agregación *in vitro*.

Péptidos interferidores	Secuencias [#]	Secuencia de tipo silvestre [¶]
Tango 1	(His) ₆ ~RLAVVLQR (SEQ ID NO: 53)	DSLAVVLQRR (SEQ ID NO: 50)
Tango 2	(His) ₆ ~RVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 54)	PSVIIWSLGNES (SEQ ID NO: 51)
Fuera de la diana	(His) ₆ ~RPITVNPFFR (SEQ ID NO: 55)	TYPITVNPFFVP (SEQ ID NO: 52)
Tango 2 Mut_1	(His) ₆ ~RVPIWSLGNR (SEQ ID NO: 56)	PSVIIWSLGNES (SEQ ID NO: 51)
Tango 2 Mut_2	(His) ₆ ~RVIPWSLGNR (SEQ ID NO: 57)	PSVIIWSLGNES (SEQ ID NO: 51)
Tango 2 Mut_3	(His) ₆ ~RVIPESLGNR (SEQ ID NO: 58)	PSVIIWSLGNES (SEQ ID NO: 51)
Tándem de Tango 2	(His) ₆ ~RVIIWSLGNRGSAPSAPAARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 59)	PSVIIWSLGNES (SEQ ID NO: 51)
[#] Los péptidos se unen al marcador de His con un enlazador de aminoácidos adicional "APAA" (SEQ ID NO: 77) en el extremo N-terminal.		
[¶] Las secuencias de tipo silvestre se muestran con sus restos flanqueantes naturales.		

Se investigó la cinética de co-agregación de β -gal y el péptido Tango 2 (HHHHHHAPAARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 54)) a 25°C. El péptido se disolvió en el tampón de ejecución y se inyectó durante 60 s a un caudal de 30 μ l min⁻¹ sobre las superficies de referencia (BSA) y de muestra (β -Gal) a un intervalo de concentraciones (0 - 4 μ M, con un replicado interno) y se dejaron disociar durante 600 s. Las series de concentración se repitieron sobre la misma superficie (tres veces) así como en superficies inmovilizadas de manera independiente. La superficie se regeneró entre cada ciclo mediante pulsos de 30 s de i) NaOH 50 mM y ii) urea 8 M y se dejó estabilizar durante 400 s antes del ciclo siguiente.

A todos los sensogramas se les restó la referencia por partida doble (Myszka, D.G., et al. J. Mol. Recognit. 12: 279-284, 1999) mediante i) resta de la respuesta observada sobre la superficie de referencia e ii) resta de las respuestas observadas para las inyecciones de tampón, esta última para eliminar los falsos positivos sistemáticos. Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de tres estados, usando el programa informático del Biacore T100, asumiendo un encuentro inicial entre el péptido en solución y la proteína sobre la placa seguido de una reorganización en dos etapas antes de que se vuelva disponible un sitio de unión idéntico en la β -lámina en crecimiento.

Se muestra una complicación de los datos a partir del análisis de SPR en las figuras 43 a 46.

La proteína β -gal se inmovilizó sobre la placa sensora mediante acoplamiento de amina, lo que puede impedir la accesibilidad de Tango zona 1 (restos 7 a 12) próximos al extremo N-terminal. Es probable que la débil afinidad de unión del péptido 1 de Tango con β -gal observada en la SPR se deba a la restricción impuesta por la proteína en el estado inmovilizado para interactuar con el péptido. Sin embargo, *in vitro*, el péptido Tango 1 muestra una mayor afinidad por β -gal libre en solución en comparación con el péptido Tango 2 que es acorde con la predicción del algoritmo Tango.

El sensograma que representa el cambio en las unidades de respuesta (UR) del instrumento en función de la concentración del analito (péptido Tango 2) se muestra en la figura 45. Las UR_{máx.} para una estequiometría 1:1 es ~80 UR, sin embargo, los presentes datos superan este valor y no se logra estabilidad incluso a concentraciones mayores y un tiempo de contacto prolongado (>10 min). Esto se debe a que después de que se haya unido el péptido a β -gal, se crea un nuevo sitio de unión que permite el crecimiento del agregado sobre la superficie de la placa sensora. Para modelar el crecimiento del agregado, se observó que era inadecuada una cinética en 1 estado o en 2 estados. Los datos cinéticos se representan mejor usando un proceso en múltiples etapas que implica un

modelo en 3 estados. De acuerdo con este modelo, el péptido se acopla de manera reversible a la diana, seguido del cambio de conformación que se bloquea en posición para recibir un péptido posterior, que se une al primer péptido y bloquea el sitio de unión. Se ha informado anteriormente que este modelo describe la elongación de la fibrilla de amiloide sobre la microplaca de SPR. La k_a y k_d para el mecanismo en 3 etapas fueron: $k_{a1} = 2,744E+4$, $k_{a2} = 0,02359$, $k_{a3} = 0,005491$ y $k_{d1} = 0,4123$, $k_{d2} = 0,02509$ $k_{d3} = 0,002654$. Debido a la complejidad del modelo, no fue posible calcular la constante de asociación en equilibrio K_a y la constante de disociación en equilibrio K_d . La cinética se vuelve incluso más compleja en caso de usar como analito el péptido de repetición en tándem (n=2 y ambos restos Y son idénticos) (véase la figura 46). En esta molécula, todos los restos X son un solo resto de R y el enlazador Z₁ es GSGSAPAA (SEQ ID NO: 90) (véase la tabla 14).

4.3 Determinación de la cinética de agregación *in vitro*

La coagregación del péptido Tango 1, el péptido Tango 2 y el péptido de repetición en tándem de Tango 2 con β -Gal *in vitro* se controló mediante dispersión de luz a partir del cambio aparente en la densidad óptica (DO) a 340 nm debido al crecimiento de partículas de agregado a temperatura ambiente. La coagregación de interferidor- β -Gal se inició añadiendo una concentración equimolar (10 μ M) de péptido Tango 1, péptido Tango 2, péptido de repetición en tándem de Tango 2 y β -Gal en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8 seguido de agitación suave de la muestra a 50 rpm. La secuencia de los interferidores se representa en la tabla 14.

Para caracterizar el tamaño de los agregados, se midió el radio hidrodinámico (RH) de β -Gal en tiempo cero y después de la incubación conjunta con péptido Tango 1, péptido Tango 2, péptido de repetición en tándem de Tango 2 (tabla 14) durante 2 h usando dispersión de luz dinámica (DLS), DynaPro DLS (Wyatt Technology Europe, Alemania).

La figura 47 muestra que el péptido Tango 1 con mayor puntuación muestra una cinética de co-agregación más rápida con la β -Gal en solución en comparación con el péptido Tango 2 *in vitro*. Cuando se añadió un péptido de repetición en tándem de Tango 2 a la β -Gal, se observó una rápida cinética de co-agregación y el tamaño de los agregados formados después de 2 h fueron mayores en comparación con los del péptido Tango 2 individual (figura 48).

Para evaluar el límite del péptido Tango 2 individual para iniciar la coagregación de β -Gal, se preparó una serie de muestras con una relación molar de β -gal a péptido de 1:0, 1:0,2, 1:0,5 y 1:1 en tampón fosfato 20 mM, pH 6,8. La concentración de β -Gal se mantuvo constante a 10 μ M mientras que la cantidad de péptido fue de 2 μ M, 5 μ M y 10 μ M. La coagregación de interferidor- β -Gal se inició agitando cuidadosamente la muestra a 50 rpm.

Los experimentos de dispersión de luz y DLS mostraron que fueron suficientes concentraciones por debajo de las estequiométricas del péptido para inducir la agregación de la β -Gal (véase la figura 49). Los agregados visibles formados de este modo no fueron solubles en urea 8 M o GdHCl 6 M.

4.4. Silenciamiento funcional de la enzima β -gal

Para estudiar el efecto del péptido interferidor Tango 2 en la función enzimática de β -Gal se evaluó la actividad catalítica antes y después de la incubación con este péptido. La lectura funcional de la enzima se llevó a cabo usando el sustrato fluoresceína-di- β -D-galactopiranosido (FDG), que no es fluorescente pero tras la escisión enzimática por β -Gal, se libera fluoresceína con una intensidad proporcional a la actividad catalítica. La figura 50 muestra el efecto de las concentraciones crecientes del péptido interferidor Tango 2 en la actividad enzimática de β -galactosidasa. Resulta evidente que las concentraciones equimolares de enzima e interferidor dan lugar a una inhibición completa de la actividad enzimática (o en otras palabras, a un silenciamiento funcional mediante coagregación completa).

4.5. Estructura del coagregado de β -gal-péptido interferidor Tango 2

El coagregado de β -gal-péptido interferidor Tango 2 se aisló después de su incubación conjunta durante 2 h. Los agregados aislados se lavaron repetidas veces con tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8 hasta que el sobrenadante mostró una absorbancia despreciable a 280 nm y se suspendió en tampón para la caracterización estructural usando espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FITR), dicroísmo circular (CD) y microscopía electrónica (EM).

Los espectros de FTIR de β -gal nativa muestran un pico de amida I a 1638 cm^{-1} característica de elementos de estructura secundarios ricos en β -láminas, que cambia a 1628 cm^{-1} debido a la formación de β -lámina intermolecular tras la coagregación con el péptido interferidor Tango 2 (figura 51). Los espectros de CD de la solución de β -gal nativa muestran características de una clase de estructura $\alpha+\beta$ mientras que los espectros de suspensión de coagregado con una banda negativa de $\sim 218 \text{ nm}$ sugiere una pérdida completa de la estructura de proteína nativa y un cambio a β -láminas coagregadas (figura 52). Finalmente, la EM del coagregado de β -gal-péptido interferidor Tango 2 ilustra que los agregados formados son de naturaleza amorfa (y por lo tanto, no amilogénicos) (figura 53).

4.6. Aplicaciones diagnósticas de los interferidores: detección de tres biomarcadores de proteína en suero

En el siguiente ejemplo se demuestra la factibilidad del uso de interferidores para aplicaciones diagnósticas. Para esto, se seleccionaron tres biomarcadores clínicamente relevantes como ejemplos para detección en suero humano: 1) antígeno específico de próstata (PSA) para el que se representa la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 4, 2) proteína C-reactiva (CRP) para la que se representa la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 5 y 3) β -2-microglobulina (β -2M) para la que se representa la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 6. Las secuencias se muestran sin su péptido de señal. Obsérvese que las regiones Tango usadas para el diseño de los interferidores específicos se subrayan en las secuencias de aminoácidos respectivas. Las secuencias de los interferidores específicos de biomarcador se representan en la tabla 15.

SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácidos del antígeno específico de próstata (PSA)

IVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPL
 YDMSLLKNRFLRPDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEFLTPKKLQCVDLHVI
 SNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERP
 SLYTKVVHYRKWIKDTIVANP

SEQ ID NO: 5: secuencia de aminoácidos de la proteína C-reactiva (CRP)

QTDMSRKAFVFPKESDTSYVSLKAPLTKPLKAFVCLHFYTELSSTRGYSIFSATKRQDNEILIFWSKDIGYSFTVGGSEI
 LFEVPEVTVAPVHICTSWESAGIVEFWVDGKPRVRKSLKKGTVGAEASIIIGQEQDSFGGNFEFSQSLVGDIGNVN
 MWDFVLPDEINTIYLGGPFSPNVLNWRALKYEVQGEVFTKPQLWP

SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de β -2-microglobulina (β -2M)

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPEKDEYACR
 VNHVTLSPKIVKWDRM

Tabla 15: Lista de secuencias de interferidores específicos usados para la detección PepBlot de tres biomarcadores de proteína en suero. El péptido de PSA de repetición en tándem está unido a biotina mediante el enlazador Ttds-APAA (SEQ ID NO: 77).

Péptido interferidor	Secuencia	Secuencia de tipo silvestre [¶]
PSA	<i>b</i> ~ RWQVLVASD (SEQ ID NO: 182)	QPWQVLVASRG (SEQ ID NO: 183)
	<i>b</i> ~ RQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 60)	HPQWVLTAAHC (SEQ ID NO: 63)
	<i>b</i> ~ RQWVLTAAARGSGSAPAARQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 89)	
CRP	<i>b</i> ~RILIFWSKR (SEQ ID NO: 61)	NEILIFW <u>SKD</u> (SEQ ID NO: 64)
β -2M	<i>b</i> ~ RWSFYLLYYTR (SEQ ID NO: 62)	KDWSFYLLYYTEF (SEQ ID NO: 65)

[¶] Las secuencias de tipo silvestre se muestran con sus restos flanqueantes naturales.

La membrana para la detección de biomarcadores de proteína se preparó del siguiente modo. A 21 μ l de suero humano al 5% (Lonza) se le añadieron 50 pmol de los biomarcadores de proteína diana (respectivamente, 1,55 ng de PSA, 1,25 ng de CRP y 0,6 ng de β -2M) y esto se mezcló con 5 μ l de tampón de carga 5x SDS con y sin DTT (Fermentas) y se calentó a 82°C durante 3 min. Se cargaron 26 μ l de esta mezcla que contiene PSA o CRP o β -2M en un gel NuPage de Bis-Tris al 4-12% de 10 pocillos y las proteínas se separaron en condiciones desnaturizantes o desnaturizantes reductoras. Después, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon durante una noche con BSA al 1% en PBS-T a 4°C.

4.6.1 Detección PepBlot y WB de PSA añadido en suero humano

Se preparó una solución madre (10 μ M) del péptido biotinilado específico para PSA (para la secuencia, véase la tabla 15) en DMSO al 100%. La solución madre del péptido se diluyó (1/40) en tampón MES 25 mM, Trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,02%, pH 5,0, de tal forma que la concentración final del péptido era de 250 nM. La solución de péptido recién preparada se añadió inmediatamente a la tira de membrana y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 1 h, se decantó la solución de péptido y la membrana se lavó 4x 10 min con tampón MES 25 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,0. Después, se incubó la membrana con reactivo de afinidad de biotina (dilución 1:100.000) de conjugado de SRP-HRP en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Esto fue seguido de un

lavado de 3x 10 min con PBS-T y finalmente se enjuagó en agua desionizada durante 10 min. Para la detección por WB de PSA añadido en suero humano, se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal de conejo anti-PSA (1:5000) (EP1588Y, Abcam) específico para el péptido C-terminal del PSA. Esto fue seguido de tinción con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo (1:30.000) conjugado con HRP. Las membranas se expusieron al reactivo de sustrato de HRP de quimioluminiscencia (sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific) y la proteína diana se visualizó usando el sistema de obtención de imágenes Bio-Rad ChemiDoc XRS.

La figura 54 muestra la comparación entre el péptido interferidor, frRQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 85) de detección (panel A) y el anticuerpo de detección para PSA (panel B). El análisis por WB de PSA ha demostrado que presenta múltiples bandas, dependiendo de las condiciones de ejecución del gel. En condiciones desnaturalizantes no reductoras se observaron dos bandas y en condiciones desnaturalizantes reductoras (no mostradas) los múltiples fragmentos parecen deberse a la escisión interna (Wang, T.J., et al, Tumor Biol. 20: 79-85, 1999).

4.6.2 Detección PepBlot y WB de CRP añadido en suero humano

Se preparó una solución madre (10 μ M) del péptido en DMSO al 100%. La solución madre del péptido se diluyó (1/40) en tampón MES 25 mM, Trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,02%, pH 5,0, de tal forma que la concentración final del péptido era de 250 nM. La solución de péptido recién preparada se añadió inmediatamente a la tira de membrana y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 60 min, se decantó la solución de péptido y la membrana se lavó 4x 10 min con tampón MES 25 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,0. Después, la membrana se incubó con reactivo de afinidad de biotina (dilución 1:30.000) de neutravidina conjugada a HRP en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Esto fue seguido por lavado 3x 10 min con PBS-T y finalmente se enjuagó en agua desionizada durante 10 min. La detección WB de CRP añadida en suero humano se llevó a cabo incubando anticuerpo monoclonal de conejo anti-CRP (1:2000) (Abcam) durante 1 h. Esto fue seguido de tinción con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo (1:30.000) conjugado a HRP. Las membranas se expusieron al reactivo de sustrato de HRP de quimioluminiscencia (sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific) y la proteína diana se visualizó usando el sistema de obtención de imágenes Bio-Rad ChemiDoc XRS. Las transferencias se muestran en la figura 55.

4.6.3 Detección PepBlot y WB de β -2M añadido en suero humano

Se preparó una solución madre (10 μ M) de péptido interferidor biotilado específico para β -2M (véase la tabla 15 para la secuencia) en DMSO al 100%. La solución madre del péptido se diluyó (1/40) en tampón MES 25 mM, Trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,02%, pH 5,0 para obtener una concentración final del péptido interferidor de 250 nM. La solución de péptido interferidor recién preparada se añadió inmediatamente a la tira de membrana y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 30 min, se decantó la solución de péptido interferidor y la membrana se lavó 4x 10 min con tampón MES 25 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 5,0. Después, se incubó la membrana con reactivo de afinidad de biotina (dilución 1:100.000) de conjugado de SRP-HRP en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Esto fue seguido de un lavado de 3x 10 min con PBS-T y finalmente se enjuagó en agua desionizada durante 10 min.

Para detectar β -2M añadido en suero humano mediante WB, la membrana se incubó con anticuerpo monoclonal de conejo anti- β -2M (1:5000) (Abcam) durante 1 h y se tiñó con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a HRP (1:30.000). Después, las tiras de membrana se expusieron al reactivo de sustrato de HRP de quimioluminiscencia (sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific) y la proteína diana se visualizó usando el sistema de obtención de imágenes Bio-Rad ChemiDoc XRS. El resultado de este análisis se muestra en la figura 56.

4.6.4 Detección de CRP y PSA en muestras humanas complejas sin adición

Para explorar si también podría aplicarse la presente estrategia para la detección cuantitativa en situaciones clínicas para detectar proteínas secretadas o filtradas de manera natural, con proteomas de otro origen, composición y complejidad distinta del lisado de *E. coli*, se diseñaron ensayos para detectar biomarcadores de proteína humana en las muestras complejas relevantes, es decir, CDP en suero de sangre humana y PSA en plasma seminal. La CRP es un biomarcador ampliamente usado para la inflamación, que proporcionó una fuente abundante de muestras de suero clínico para las que había disponibles determinaciones de CRP basadas en ensayos inmunoturbidimétricos independientes.

Para la detección de CRP en suero, se usó el péptido sonda b~RILIFWSR (SEQ ID NO: 86), que es único para CRP. La detección de CRP en suero se llevó a cabo usando muestras clínicas de dos pacientes que contenían cantidades bajas (1 μ g ml⁻¹) y altas (317 μ g ml⁻¹) de CRP. La muestra de suero se diluyó al 7% en agua MilliQ y se mezcló con tampón de carga 5x SDS, calentado a 82°C durante 5 min. Las proteínas desnaturalizadas se sometieron a electroforesis en geles de Bis-Tris al 4-12%, se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se bloquearon con BSA al 1% en suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4 y Tween 20 al 0,05% (PBS-T). Las membranas se agitaron con péptido b~RILIFWSR (SEQ ID NO: 86) 250 nM formulado en tampón MES 10 mM a pH

5,1, trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,05% y DMSO al 2,5% a 25°C durante 1 h. Después de enjuagar con tampón MES 10 mM a pH 5,1, Tween 20 al 0,05%, se tiñeron las membranas con conjugado de SRP-HRP y se visualizaron usando el sistema de obtención de imágenes ChemiDoc XRS de Bio-Rad.

5 La detección por inmunotransferencia de CRP se logró usando anticuerpo monoclonal de conejo anti-CRP (1:2000) con agitación suave. Después de 1 h, se enjuagó la membrana con PBS-T, se tiñó con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado a HRP (Promega) durante 1 h y después se expuso a reactivo de quimioluminiscencia (sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific) y la proteína se visualizó usando el sistema de obtención de imágenes Bio-Rad ChemiDoc XRS. Los resultados se muestran en la figura 57.

10 Posteriormente, se procedió a evaluar la utilidad diagnóstica del presente péptido sonda para detectar CRP en muestras de suero clínico. Se procesaron muestras de sangre de 20 pacientes (Universiteit Ziekenhuis, Leuven) de acuerdo con un protocolo convencional y se separó el suero para analizar la CRP con diagnósticos de laboratorio convencionales que emplean un ensayo de inmunoturbidimetría y PepBlot. La concentración de CRP se midió mediante un método basado en inmunoturbidimetría usando partículas de látex acopladas a anticuerpo monoclonal de ratón anti-CRP. La prueba se llevó a cabo en un sistema Modular P de Hitachi/Roche (Roche Diagnostics).

15 El análisis PepBlot de las 20 muestras clínicas mostradas en la figura 58 reveló tinción específica en una banda bien definida correspondiente al peso molecular de CRP. La cuantificación de la intensidad de estas bandas se compara bien con los datos obtenidos a partir del ensayo inmunoturbidimétrico clínico convencional, efectuado de manera independiente en las mismas muestras.

20 A continuación, se diseñó un ensayo PepBlot para la detección de PSA, un miembro de la familia de proteasas de calicreína tisular que se sintetiza en la glándula prostática, secretada en el fluido seminal y se usa como biomarcador para el cáncer de próstata. Se sintetizaron péptidos que se dirigían a la secuencia W₁₄QVLVAs₂₀ y a la secuencia Q₃₄WVLTAA₄₀ que se habían predicho mediante Tango (véase la tabla 15).

25 Se recogió semen de un donante y se dejó licuar a temperatura ambiente. Después de 2 h, se centrifugó el fluido seminal a 10.000 xg durante 15 min para separar el plasma de las células espermáticas. Se fraccionó una muestra de plasma seminal al 10% en condiciones no reductoras usando electroforesis en gel desnaturante, se transfirió a una membrana de PVDF y se bloqueó usando el protocolo descrito para la electroforesis de suero. Los carriles de la membrana se agitaron por separado con 250 nM del péptido b'RWQVLASD (SEQ ID NO: 88) o el péptido b'RQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 85) o 250 pM del péptido de repetición en tándem b'RQWVLTAAARGSGSAPAARQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 89) formulado en tampón MES 10 mM, pH 5,1, trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,05% y DMSO al 2,5% a 25°C durante 1 h. Después, se enjuagaron las membranas en tampón MES 10 mM, pH 5,1, Tween 20 al 0,05% y se tiñeron con SRP conjugado a HRP y se visualizó con el sistema ECL. En paralelo, la detección WB de PSA en plasma seminal se llevó a cabo incubando la membrana con anticuerpo monoclonal de conejo anti-PSA (1:5000) (EP1588Y, Abcam) específico para el péptido C-terminal de PSA. Esto fue seguido de tinción con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado a HRP y se visualizó usando el sistema ECL.

30 Tal como puede observarse en la figura 59A, los péptidos (b'RWQVLASD (SEQ ID NO: 88) y b'RQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 85)) se acumularon en una banda de proteína con un peso molecular aparente de aproximadamente 30 kDa que se identificaron mediante el anticuerpo como específico para la secuencia C-terminal de PSA. Ambos péptidos pueden detectar PSA a niveles comparables a los del anticuerpo. Obsérvese que el resto constitutivo de D del péptido WQVLAS se selecciona para proporcionar una carga complementaria al resto flanqueante en la secuencia de proteína. Curiosamente, puede lograrse una señal de banda fuerte usando una concentración suficientemente baja (250 pM) de la repetición en tándem (n=2 y ambos restos Y son idénticos) del péptido interferidor b'RQWVLTAAARGSGSAPAARQWVLTAAAR (SEQ ID NO: 89) como sonda (figura 59 B). En esta molécula, todos los restos X son un solo resto de R y el enlazador Z₁ es GSGSAPAA (SEQ ID NO: 90). Este resultado sugiere que la detección del biomarcador puede reforzarse usando secuencias de agregación repetidas (es decir, aquellas con n al menos 2 y de las cuales, al menos dos Y_i son idénticas entre sí y con una región en una proteína) y las sondas pueden diluirse adicionalmente en solución. Como confirmación adicional, se llevó a cabo una digestión con tripsina y análisis por espectrometría de masas como secuenciación N-terminal, que confirman a PSA como el principal componente de la banda.

4.6.5 Detección de las citocinas interleucina 1-β (IL1β) y factor de necrosis tumoral α (TNFα) en suero humano

35 Se añadieron por separado 5 μg de cada una de las citocinas interleucina 1-β (IL1β) y factor de necrosis tumoral α (TNFα) en suero humano al 5% y se separaron por electroforesis usando un gel de Bis-Tris al 4-12%, se transfirieron a membrana de PVDF y se bloquearon con BSA al 1% en PBS-T. Como control, un carril adyacente a la muestra de suero contenía únicamente 5 μg de IL1β o 5 μg de TNFα.

40 Se detectó IL1β usando los péptidos (b~RQQVVFMSFVQD (SEQ ID NO: 184) y b~KQQVVFMSFVQD (SEQ ID NO: 185)). Se prepararon soluciones madre 10 μM de los péptidos por separado en DMSO y se diluyeron en el tampón de formulación (MES 10 mM, trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4). Las membranas se agitaron

cuidadosamente con la formulación de péptido a 25°C durante 1 h. Después de cuatro enjuagues en tampón MES 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4, las membranas se tiñeron con el reactivo de afinidad de biotina SRP conjugado a HRP. Los resultados de esta detección PepBlot se presentan en la figura 60.

- 5 Para la detección de TNF α , los péptidos a 10 μ M (*b*-RGLYUYSQVLFP (SEQ ID NO: 186), *b*-RGLYLIYSQVLFH (SEQ ID NO: 187)) se diluyeron (1/40) por separado en tampón de formulación (MES 10 mM, trehalosa 100 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 6,5) y se agitaron suavemente con las membranas a 25°C durante 1 h. Después de cuatro enjuagues en tampón MES 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 6,5, las membranas se tiñeron con el reactivo de afinidad de biotina SRP conjugado a HRP. Los datos de PepBlot de la detección de TNF α usando los péptidos interferidores se mostraron en la figura 61.

4.7 Detección cuantitativa de proteínas usando ELISA

- 15 Para explorar las aplicaciones de la presente tecnología en otras tecnologías de diagnóstico, se incorporaron los marcadores de proteínas de agregación selectivos diana en una plataforma cuantitativa como ELISA. En esta estrategia, se investigó la selectividad y la sensibilidad de las sondas peptídicas para detectar marcadores de proteína de interés en medios complejos en placas de microtitulación. En primer lugar, se tituló β -gal en lisados de *E. coli* no inducidos y se capturaron los lisados celulares completos sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después, se sondó la proteína capturada con un péptido de repetición en tándem, frRVIWVSLGNGRSGSAPAARVVIWVSLGNGR (SEQ ID NO: 91) generado contra β -Gal. (Repetición en tándem significa que n=2 y ambos restos Y son idénticos (en este caso, VIIWVSLGN (SEQ ID NO: 76)). En esta molécula, todos los restos X son un solo resto de R y el enlazador Z₁ es GSGSAPAA (SEQ ID NO: 90)). La HRP conjugada a SRP actuó como reactivo secundario y la señal se detectó mediante ensayo calorimétrico a 450 nm. Los presentes resultados muestran una buena correlación con la concentración de β -Gal en los lisados celulares completos, tal como se muestra en la fig. 62. (Obsérvese que estos datos son similares a la detección de la proteína ClpC en un ensayo de transferencia por puntos, mostrado en el ejemplo 2 (fig. 30)).

4.8 Detección cuantitativa de proteínas usando el sensor ForteBio Octet

- 30 Como estrategia alternativa, se probó una configuración de ensayo sin marcadores, usando la tecnología de interferometría de biocapas (BLI) (Octet, ForteBio) en el que se inmovilizaron los péptidos sonda de repetición en tándem contra β -Gal y CRP sobre las sondas sensoras. Los biomarcadores de proteína recombinante (β -gal y CRP) solubilizados en suero salino tamponado con fosfato, pH 6,8 que contenía Tween 20 al 0,015% y EDTA 3 mM se titularon en las placas de micropocillos y después, se leyó directamente la interacción con el péptido diana usando un instrumento Octet (ForteBio). La alta sensibilidad del sensor significa que pueden detectarse concentraciones picomolares de los analitos. Estos resultados (mostrados en las figuras 63 y 64 para β -Gal y CRP, respectivamente) sugieren que los ensayos basados en péptidos tienen el potencial de llevar a cabo la detección cuantitativa de biomarcadores, incluyendo biomarcadores humanos, en diagnósticos clínicos que pueden incorporarse fácilmente en una plataforma de tecnología conocida.

4.9 Micromatriz peptídica para la detección de proteínas

- 45 De manera similar al recubrimiento de los interferidores sobre las sondas sensoras en el ejemplo 4.8, los experimentos iniciales demostraron que los péptidos interferidores descritos en el presente documento pueden inmovilizarse covalentemente sobre una membrana de celulosa y usarse para la detección de proteínas (ensayo basado en la plataforma PepSpot™ (JPT, GmbH)). Esto permite la detección simultánea de múltiples proteínas (se usaron juntas más de 50 sondas; datos no mostrados).

- 50 Para evaluar si estos péptidos también pueden usarse en otros formatos de micromatriz, se llevó a cabo un experimento preliminar para diseñar una micromatriz de péptido sobre portaobjetos de vidrio usando micromatrices de péptido PepStar™ (JPT, GmbH). Los péptidos se diseñaron contra diez dianas diferentes; estos péptidos incluyen Hit1, Hit57 (véase el ejemplo 2), péptidos contra β -Gal, p53, p16, CS (citrato sintasa), CRP, PSA, SEGN (Secretagogina) y A2MG (α -2-Macroglobulina). Los péptidos se sintetizaron y se depositaron por puntos (500 μ mol) sobre el portaobjetos de vidrio con 5 tamaños de punta distintos: 62,5 μ m, 165 μ m, 265 μ m, 335 μ m y 400 μ m. Se incluyeron puntos por triplicado (62,5 μ m) de biotina en la matriz junto con cada tamaño de punta como marcador.

- 60 Se probaron diferentes variaciones de los péptidos: péptidos flanqueados con restos constitutivos naturales (es decir, fragmentos de proteína cortos que contienen el resto Y_i), el resto Y_i flanqueado por un resto constitutivo de Arg en ambos lados (es decir, n=1, X₁=X₂=R), y péptidos que tienen una repetición en tándem con restos constitutivos de Arg (es decir, n=2, todos los restos X son igual a R, Y₁=Y₂). Además, los péptidos "individuales" - aquellos con solo un resto Y - se unieron al portaobjetos de vidrio usando dos longitudes de enlazador diferentes. Cada portaobjetos de vidrio tiene 3 repeticiones de los péptidos.

- 65 En la tabla 16 se proporciona una revisión general de todos los péptidos. Para los péptidos flanqueados naturales, el enlazador corto consistía en la secuencia GS (seguida de uno o dos restos y después el resto Y_i). El enlazador largo es GSPGSPGS (SEQ ID NO: 188). Para los péptidos interferidores individuales, el enlazador corto consiste en la

secuencia GSA (seguido de un resto de R, el primer resto constitutivo) y el enlazador largo es GSPGSPGSA (SEQ ID NO: 189). Para los péptidos de repetición en tándem, se usó GA o GAS como enlazador.

5 La muestra de suero de un paciente que contenía 317 µg ml⁻¹ de CRP se diluyó al 10% en PBS-T antes de la incubación. Se pipetearon 300 µl de suero al 10% sobre el portaobjetos, después se cubrió con una lámina de vidrio y se incubó durante 1 h a 37°C. Los portaobjetos se lavaron 3x 10 min en PBS-T y se incubaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CRP (Abcam) durante 1 h seguido de un anticuerpo de cabra anti-conejo a 1:1000 marcado con DyLight 488 (Thermo). Para visualizar los marcadores de biotina, se incluyó una etapa adicional donde los portaobjetos se incubaron con SRP conjugado con DyLight 594. Los portaobjetos se escanearon usando un escáner GenePix 4400 (Molecular devices) en los canales de 488 nm y 594 nm.

Tabla 16. Lista de péptidos transferidos por puntos sobre la micromatriz de péptido usada para detectar CRP en suero humano.

Identificador del interferidor	Péptidos con flancos naturales	Flancos naturales con enlazador largo	Señuelo flanqueado con R
Bgal	GSPSVIIWSLGNE (SEQ ID NO: 190)	GSPGSPGSPSVIIWSLGNE (SEQ ID NO: 191)	GSARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 192)
hit57	GSELFNFLKR (SEQ ID NO: 193)	GSPGSPGSELFNFLKR (SEQ ID NO: 194)	GSARLFNFLR (SEQ ID NO: 195)
hit1	GSDWVSMLLR (SEQ ID NO: 196)	GSPGSPGSDWVSMLLR (SEQ ID NO: 197)	GSARWVSMLLR (SEQ ID NO: 198)
p53	GSRPILTIITLE (SEQ ID NO: 199)	GSPGSPGSRPILTIITLE (SEQ ID NO: 200)	GSARILTIITLR (SEQ ID NO: 201)
p16	GSLDTLWLH (SEQ ID NO: 202)	GSPGSPGSLDTLVLH (SEQ ID NO: 203)	GSARTLVVLHR (SEQ ID NO: 204)
Citrato sintasa	GSEGLFWLLVTGHIP (SEQ ID NO: 205)	GSPGSPGSEGLFWLLVTGHIP (SEQ ID NO: 206)	GSARLFWLLVTGHIR (SEQ ID NO: 207)
CRP_Humano	GSNEILIFWSK (SEQ ID NO: 208)	GSPGSPGSNEILIFWSK (SEQ ID NO: 209)	GSARILIFWSR (SEQ ID NO: 210)
PSA_Humano	GSPQWVLTAAH (SEQ ID NO: 211)	GSPGSPGSPQWVLTAAH (SEQ ID NO: 212)	GSARQWVLTAAR (SEQ ID NO: 213)
A2MG_Human	GSEVMFLTVQVK (SEQ ID NO: 214)	GSPGSPGSEVMFLTVQVK (SEQ ID NO: 215)	GSARVMFLTVQVR (SEQ ID NO: 216)
SEGN_Humano	GSDAFFLHMLMK (SEQ ID NO: 217)	GSPGSPGSDAFFLHMLMK (SEQ ID NO: 218)	GSARAFFLHMLMR (SEQ ID NO: 219)

Identificador del interferidor	Señuelo flanqueado con R con enlazador largo	Repetición en tándem
Bgal	GSPGSPGSARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 220)	GARVIIWSLGNRGSARVIIWSLGNR (SEQ ID NO: 221)
hit57	GSPGSPGSARLFNFLR (SEQ ID NO: 222)	GARLFNFLRGSARLFNFLR (SEQ ID NO: 223)
hit1	GSPGSPGSARWVSMLLR (SEQ ID NO: 224)	GARWVSMLLRGSRWVSMLLR (SEQ ID NO: 225)
p53	GSPGSPGSARILTIITLR (SEQ ID NO: 226)	GASRILTIITLRGSRILTIITLR (SEQ ID NO: 227)
p16	GSPGSPGSARTLVVLHR (SEQ ID NO: 228)	GATLVVLHRGSRTLVLHR (SEQ ID NO: 229)
Citrato sintasa	GSPGSPGSARLFWLLVTGHIR (SEQ ID NO: 230)	GARLFWLLVTGHIRGSRLFLLVTGHIR (SEQ ID NO: 231)
CRP_Humano	GSPGSPGSARILIFWSR (SEQ ID NO: 232)	GASRILIFWSRGSRILIFWSR (SEQ ID NO: 233)
PSA_Humano	GSPGSPGSARQWVLTAAR (SEQ ID NO: 234)	GARQWVLTAARGSRQWVLTAAR (SEQ ID NO: 235)
A2MG_Human	GSPGSPGSARVMFLTVQVR (SEQ ID NO: 236)	GARVMFLTVQVRGSRVMLTVQVR (SEQ ID NO: 237)
SEGN_Humano	GSPGSPGSARAFFLHMLMR (SEQ ID NO: 238)	GARAFFLHMLMRGSRAFFLHMLMR (SEQ ID NO: 239)

Los resultados para los péptidos flanqueados por "R" con enlazadores largos y los péptidos en tándem flanqueados por "R" se muestran en la fig. 65.

- 5 Aunque este es únicamente un experimento preliminar y se necesita una optimización adicional, los resultados son prometedores. Como era de esperar, los resultados para la menor concentración de CRP no son concluyentes (datos no mostrados). Para la mayor concentración de CRP, sin embargo, los péptidos que muestran de manera relativa la mayor relación de señal a ruido son los péptidos interferidores individuales para CRP y los péptidos de repetición en tándem para CRP. Además, estas también son las señales mayores para cada uno de los portaobjetos de micromatriz y ambas señales tienen una relación de señal a ruido mayor de 2,5.
- 10 El uso de la secuencia nativa no parece dar como resultado una detección eficaz de CRP. Sin quedar ligados a un mecanismo particular, esto podría deberse, al menos en parte, al hecho de que las secuencias naturales que flanquean al resto de agregación de CRP contienen una carga opuesta (resto de E negativo N-terminal, resto de K positivo C-terminal). En dichos casos, podría ser mejor proporcionar complementación de cargas en los restos constitutivos, para evitar la repulsión de las cargas idénticas y la atracción por las opuestas (en otras palabras, para evitar que los péptidos no se alineen correctamente debido a las cargas que los empujan hacia la orientación inversa).

- 20 Se cree que una optimización adicional (por ejemplo, otros enlazadores, variación de los restos constitutivos, formulación, pretratamiento del portaobjetos, cinética, temperatura y otras variables del protocolo) proporcionarán resultados aún mejores, lo que indica que los péptidos interferidores pueden usarse en formato de micromatriz para detectar múltiples analitos en muestras complejas, tales como suero clínico.

5. Aplicaciones médicas no infecciosas

- 25 5.1 Agregación dirigida de receptores de hormona del crecimiento

5.1.1 Introducción

- 30 La superfamilia de tirosina cinasas receptoras (RTK) es una diana clave para el desarrollo de fármacos para el cáncer (Zhang et al., Nat Rev Cancer 2009; 9(1):28). Las terapias anticáncer actuales se dirigen principalmente a las cinasas, tales como los miembros de los receptores de factor de crecimiento epidérmico, que normalmente también aportan efectos anti-angiogénicos. Sin embargo, normalmente es desalentador identificar inhibidores para cada una de estas moléculas que sean específicos.

- 35 Por lo tanto, se intentó usar como diana las RTK usando las moléculas descritas en el presente documento. Mediante la selección de un conjunto de péptidos diseñados para inducir la agregación de manera específica, se identificaron varios péptidos nuevos dirigidos contra EGFR y VEGFR2 que son capaces de inhibir la señalización funcional a través de estos receptores.

- 40 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señalización importante implicada, entre otros, con la angiogénesis. Hay tres subtipos principales de receptores para VEGF, numerados 1, 2 y 3. De estos, VEGFR-2 (también conocido como KDR o Flk-1) parece mediar la mayor parte de las respuestas celulares conocidas al VEGF. Una de las vías activadas tras la unión de VEGF a VEGFR-2 es la vía de ERK, que da lugar a la fosforilación de Erk1/2. Teniendo en consideración la importancia de la angiogénesis en los cánceres, en la actualidad se están probando diferentes inhibidores de VEGFR-2 por su potencial como fármaco anticáncer (por ejemplo, Guo et al., Biochim Biophys Acta. 2010; 1806(1): 108-21; Subramanian et al., Clin Lung Cancer. 2010; 11(5):311-9; ramucirumab: Sprattlin, Curr Oncol Rep. 2011; 13(2):97-102; vandetanib: Morabito et al., Drugs Today (Barc). 2010; 46(9):683-98). Además, los compuestos anti-VEGFR2 también son prometedores en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad contrarrestando la neovascularización coroidal (Miao et al., Biochem Biophys Res Commun. 2006; 345(1):438-45; Takahashi et al., Curr Eye Res. 2008; 33(11):1002-10; Chappelow y Kaiser, Drugs. 2008; 68(8):1029-36).

- 55 El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una tirosina cinasa receptora de la familia ErbB. Se han identificado cuatro miembros de la familia de ErbB; EGFR (también conocido como ErbB1, HER1), EGFR2 (ErbB2 o HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). La señalización de EGFR se inicia mediante la unión del ligando al dominio de unión a ligando extracelular. La unión de la proteína a un ligando induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de la tirosina y da lugar a la proliferación celular. Las mutaciones en este gen se asocian con cáncer de pulmón, se ha demostrado que una amplificación o sobreexpresión de este gen desempeña un papel importante en la patogénesis y la progresión de ciertos tipos agresivos de cáncer de mama. En los últimos años ha llegado a ser un biomarcador importante y una diana para la terapia para enfermedades. Por ejemplo, EGFR2 es la diana del anticuerpo monoclonal trastuzumab (comercializado como Herceptin).

- 65 Se diseñaron péptidos agregantes contra estos receptores del modo que ya se ha explicado en el presente documento. Estos consisten en dos secuencias agregantes de núcleo (los restos Y_i tomados del núcleo agregante de la secuencia de proteína), flanqueados por restos constitutivos de D o R (los restos X numerados). En la mayoría de casos, los restos Y_i son idénticos (péptidos de "repetición en tándem"), pero en algunos, los restos Y_i

corresponden a dos dominios agregantes diferentes en el receptor. Para estas moléculas donde n=2, el resto Z₁ es un enlazador rico en prolina que asegura que ambos dominios de núcleo se encuentran disponibles para la agregación.

5 5.1.2 Uso de diana de VEGFR2 con péptidos interferidores

Se diseñaron diferentes péptidos interferidores basándose en la presencia de regiones propensas a la agregación en la proteína VEGFR2 murina (en el péptido de señal, la región extracelular, la región transmembrana o la región citoplasmática). Para probar la capacidad de los péptidos para interferir con la señalización de VEGFR tras la unión al ligando, se llevó a cabo el siguiente ensayo. En primer lugar, se sobreexpresó mVEGFR2 en células HEK293 mediante transfección FuGENE. Las células HEK293 están desprovistas de VEGFR2 endógeno. Las células se cultivaron durante un día y posteriormente se les privó de alimento durante una noche en presencia de péptido 10 o 20 µM (o control de vehículo) en DMSO. A continuación, se estimuló a las células con 25ng/ml de VEGF durante 5 min en medio de privación de alimento/péptido y se analizó la cascada de señalización aguas abajo mediante la cascada de fosforilación de MAP cinasa estudiando tanto la fosforilación de ERK1/2 como los niveles totales de ERK1/2. Esto se evaluó usando transferencia de Western o un ELISA, más cuantitativo.

Se diseñó una matriz de péptidos y se sintetizó por JPT GmbH a escala nanomolar. Los péptidos se dirigieron a varias zonas de agregación en VEGFR2 de ratón. Las secuencias exactas de los péptidos se muestran en la tabla 17. Cada péptido se disolvió en DMSO a una concentración de 5 mM y, después de su uso, se mantuvo congelado a -20°C.

Tabla 17. Secuencias de péptido que se dirigen a VEGFR2 de ratón.

Péptido con resto constitutivo de R	Péptido con resto constitutivo de D	Localización en el receptor
RLAVALWFRPPRLAVALWFR (SEQ ID NO: 240)	DLAVALWFDPPDLAVALWFD (SEQ ID NO: 241)	Péptido de señal predicho
RIASTVYVRPPRIASTVYVR (SEQ ID NO: 242)	DIASTVYVDPPDIASTVYVD (SEQ ID NO: 243)	Extracelular
RILTILANRPPRILTILANR (SEQ ID NO: 244)	DILTILANDPPDILTILAND (SEQ ID NO: 245)	Extracelular
RVILVGTTRPPRVILVGTTR (SEQ ID NO: 246)	DVILVGTDPPDVILVGTD (SEQ ID NO: 247)	Transmembrana
RMISYAGMRPPRMISYAGMR (SEQ ID NO: 248)	DMISYAGMDPPDMISYAGMD (SEQ ID NO: 249)	Extracelular
RLMVIVEFRPPRLMVIVEFR (SEQ ID NO: 250)	DLMVIVEFDPPDLMVIVEFD (SEQ ID NO: 251)	Citoplasmático
RTVSTLVIRPPRTVSTLVIR (SEQ ID NO: 252)	DTVSTLVIDPPDTVSTLVID (SEQ ID NO: 253)	Extracelular
RLICYSFQRPPRLICYSFQR (SEQ ID NO: 254)	DLICYSFQDPPDLICYSFQD (SEQ ID NO: 255)	Citoplasmático
RVISFHVIRPPRVISFHVIR (SEQ ID NO: 256)	DVISFHVIDPPDVISFHVID (SEQ ID NO: 257)	Extracelular
RGYLSIVMRPPRGYLSIVMR (SEQ ID NO: 258)	DGYLSIVMDPPDGYLSIVMD (SEQ ID NO: 259)	Citoplasmático
RLAVALWFRPPRIASTVYVR (SEQ ID NO: 260)	DLAVALWFDPPDIASTVYVD (SEQ ID NO: 261)	Péptido de señal predicho + extracelular
RIASTVYVRPPRILTILANR (SEQ ID NO: 262)	DIASTVYVDPPDILTILAND (SEQ ID NO: 263)	Extracelular
RILTILANRPPRVILVGTTR (SEQ ID NO: 264)	DILTILANDPPDVILVGTD (SEQ ID NO: 265)	Extracelular + transmembrana
RVILVGTTRPPRMISYAGMR (SEQ ID NO: 266)	DVILVGTDPPDMISYAGMD (SEQ ID NO: 267)	Transmembrana + extracelular
RMISYAGMRPPRLMVIVEFR (SEQ ID NO: 268)	DMISYAGMDPPDLMVIVEFD (SEQ ID NO: 269)	Extracelular + citoplasmático
RLMVIVEFRPPRTVSTLVIR (SEQ ID NO: 270)	DLMVIVEFDPPDTVSTLVID (SEQ ID NO: 271)	citoplasmático + extracelular
RTVSTLVIRPPRLICYSFQR (SEQ ID NO: 272)	DTVSTLVIDPPDLICYSFQD (SEQ ID NO: 273)	Extracelular + citoplasmático

Péptido con resto constitutivo de R	Péptido con resto constitutivo de D	Localización en el receptor
RLICYSFQRPPRVISFHVIR (SEQ ID NO: 274)	DLICYSFQDPPDVISFHVID (SEQ ID NO: 275)	citoplasmático + extracelular
RVISFHVIRPPRGYLSIVMR (SEQ ID NO: 276)	DVISFHVIDPPDGYLSIVMD (SEQ ID NO: 277)	Extracelular + citoplasmático

Las pruebas se efectuaron en primer lugar con péptidos sintetizados a microescala, que proporcionaron dos péptidos que redujeron significativamente (es decir, en más de un 75%) la fosforilación de ERK1/2 después del tratamiento (resultados de 3 experimentos independientes, datos no mostrados). Estos péptidos que muestran de manera repetida el mayor efecto en la fosforilación de ERK se reordenaron como péptidos de alta pureza y se probaron nuevamente en el mismo ensayo. Para comparar diferentes protocolos de aumento de escala, se obtuvieron los péptidos de dos fuentes: JPT GmbH, Berlín y el laboratorio del profesor Kris Gevaert (University Gent). Los resultados de 2 de estos péptidos de alta pureza se muestran en la figura 66.

Cada una de las producciones de péptido resultaron ser igualmente potentes. El péptido B8 tiene la secuencia DLAVALWFDPPDLAVALWFD (SEQ ID NO: 241), el péptido B12 DMISYAGMDPPDMISYAGMD (SEQ ID NO: 249). La estructura de estas moléculas corresponde a la fórmula indicada en la solicitud, donde n es dos, X₁ a X₄ es 1 aminoácido (es decir, D) Y₁ es 7 aminoácidos y es idéntico a Y₂, Z₁ es un enlazador de dos aminoácidos (es decir, PP) y Z₂ está ausente. Los restos Y de B8 (LAVALWF (SEQ ID NO: 278)) corresponden a parte de la secuencia del péptido de señal predicho de VEGFR2, los restos Y de B12 (MISYAGM (SEQ ID NO: 279)) son idénticos a parte de la secuencia extracelular de VEGFR2. Obsérvese que estas 7 secuencias de aminoácidos están codificadas de manera única en el genoma de ratón, es decir, estas 7 series contiguas de aminoácidos se encuentran únicamente en mVEGFR2 y no en otras proteínas de ratón. Sin quedar ligados a un mecanismo particular, ya que el péptido B8 se dirige al péptido de señal, es más probable que la inhibición se produzca tras la traducción de la proteína VEGFR2 (es decir, antes de que se escinda el péptido de señal), lo que indica que este péptido se internaliza por la célula.

Tal como se muestra en la fig. 66A, ambos péptidos suprimen prácticamente por completo la fosforilación de ERK1/2, mientras que no interfieren con los niveles totales de ERK1/2. Este efecto ya se observa con 5 µM de péptido. Si se representa la relación de ERK fosforilado frente a ERK total presente, puede verse que la adición de las moléculas interferidoras suprime la señalización inducida por ligando de VEGFR-2: la relación se encuentra en el intervalo de las células no estimuladas y es mucho menor que la de aquellas que se estimularon con la misma cantidad de VEGF pero sin péptidos interferidores (fig. 66B).

Para evaluar la especificidad de los péptidos identificados, se diseñó un conjunto de péptidos basándose en la secuencia de los péptidos B8 o B12, pero que contienen mutaciones adicionales con restos de prolina en las regiones de agregación de núcleo. El uso de estos péptidos "inactivados" no mostró una reducción significativa en la fosforilación de ERK1/2 (datos no mostrados).

Como etapa siguiente, para probar la especificidad de los péptidos de VEGFR2, se probó su reactividad cruzada frente a la familia de EGFR. Por lo tanto, se trató a células HeLa con péptido B8 y B12 y posteriormente se las estimuló con EGF (25ng/ml). Con esta configuración, B8 y B12 no inhiben la fosforilación de ERK1/2, lo que indica que estos péptidos (i) son específicos para VEGFR2 y (ii) no afectan a la actividad celular general de la cascada de ERK1/2 ya que EGFR2 y VEGFR2 usan cascadas de señalización prácticamente idénticas (figura 67)

Para entender mejor el mecanismo celular de la inhibición de péptidos, se llevó a cabo un experimento preliminar en el que se tiñeron células con un anticuerpo anti-VEGFR2 para hacer un seguimiento de la localización celular. Tal como puede observarse en la figura 68, en las células tratadas con control, VEGFR2 estaba presente principalmente sobre la membrana celular de células HEK293. Sin embargo, después del tratamiento durante una noche de células con 10 µM de péptido B8, las moléculas de VEGFR2 ya no estaban presentes sobre la superficie celular, pero estaba presente en vesículas intracelulares que con gran probabilidad contenían VEGFR2 agregado.

Por lo tanto, tal como muestran estos experimentos, pueden usarse péptidos interferidores para dirigirse de manera específica e inhibir la función de una sola proteína (a este respecto, obsérvese que la secuencia LAVALWF (SEQ ID NO: 278) de B8 no está codificada en el genoma humano (y por lo tanto no está presente en células HEK293) y la secuencia MISYAGM (SEQ ID NO: 279) de B12 es única para VEGFR2 en seres humanos (pero normalmente no se expresa en células HEK293)). Dado el papel establecido de VEGFR-2 en la patología del cáncer y la AMD y los ensayos clínicos centrados en la inhibición de VEGFR-2, los péptidos como los descritos tienen un alto potencial en el tratamiento de estas enfermedades. Ya que la secuencia (de ratón) usada para el péptido B12 también está presente en VEGFR-2 humano, se espera que este péptido pueda mostrar reactividad cruzada y pueda usarse para terapia en seres humanos.

5.1.2.1 Inhibición de VEGFR2 en un modelo de neovascularización coroidal (CNV)

La neovascularización coroidal (CNV) es una de las graves consecuencias patológicas de la etapa final de la degeneración macular asociada a la edad (AMD). Diversas líneas de pruebas implican niveles aumentados de señalización de VEGF en las retinas de pacientes con AMD y se ha demostrado que la inhibición de VEGFR2 inhibe la neovascularización en un modelo de CNV. Para probar si los péptidos interferidores dirigidos contra VEGFR2 pueden inhibir la función de VEGFR2 *in vivo*, se evaluaron en un modelo murino de neovascularización (es decir, CNV inducida por láser). Este modelo se ha descrito anteriormente (Lambert et al., FASEB Journal; 15:1021-1027, 2001).

Brevemente, la configuración experimental fue la siguiente:

se aplicaron 3 quemaduras con láser en el día 1 en el ojo derecho de ratones C57/BL6. En el día 1 y el día 3, se administró 1 μ l de DMSO (control negativo), B8-FITC o B12-FITC (los péptidos interferidores marcados con isotiocianato de fluoresceína) o DC101 (un mAb anti-VEGFR-2, Fischer et al., Cell, 131: 463-475, 2007). Los péptidos interferidores se proporcionaron en forma de una solución 5 mM en DMSO, tratadas con ultrasonidos antes de la inyección. En el día 5, se perfundieron los ojos con TRITC-dextrano, se sacrificó compasivamente a los ratones y se les diseccionó, seguido de un montaje plano de la retina. Se tomaron fotografías y se determinó el % de vasos frente al área total de la lesión.

Los resultados se muestran en la fig. 69.

Tal como puede verse a partir de la figura, hay una clara reducción de la neovascularización tras el tratamiento con interferidores. Sin embargo, el efecto no es tan grande como el de DC101, pero es un anticuerpo muy bien caracterizado, mientras que aún no se han optimizado los péptidos. El experimento se repetirá a lo largo de un transcurso de tiempo de 14 días, posiblemente con administración repetida, ya que esto permitirá una mejor discriminación entre la neovascularización real y la respuesta inflamatoria.

5.1.3 Uso de diana de EGFR2 con péptidos interferidores

Los péptidos para EGFR2 están diseñados para dirigirse al receptor de EGFR2 humano. Por lo tanto, para estos ensayos, se usaron inicialmente células HeLa, ya que estas células expresan de manera endógena EGFR1 y EGFR2. Después de la estimulación con EGF (25 ng/ml), también se induce la fosforilación de ERK1/2, de tal forma que pueden usarse los mismos ensayos como se ha descrito para VEGFR2.

En lo referente a VEGFR2, se diseñó una matriz de péptidos y se sintetizó por JPT a escala nanomolar, que se dirigen cada uno a varias zonas de agregación en EGFR2 humano (ErbB2 o HER2). Las secuencias exactas de los péptidos se muestran en la tabla 18. Cada péptido se disolvió en DMSO a una concentración de 5 mM y, después de su uso, se mantuvo congelado a -20°C.

Tabla 18. Secuencias de péptido que se dirigen a EGFR2 humano

Péptido con resto constitutivo de R	Péptido con resto constitutivo de D	Localización en el receptor
RSLTSTVQRPPRSLTSTVQR (SEQ ID NO: 280)	DSLSTSTVQDPPDSLSTSTVQD (SEQ ID NO: 281)	Dominio intracelular
RVWSYGVTRPPRVWSYGVTR (SEQ ID NO: 282)	DVWSYGVTDPPDVWSYGVTD (SEQ ID NO: 96)	Dominio intracelular
RITGYLYIRPPRITGYLYIR (SEQ ID NO: 283)	DITGYLYIDPPDITGYLYID (SEQ ID NO: 97)	Dominio extracelular
RLLGISLTRPPRLLGISLTR (SEQ ID NO: 284)	DLLGISLTDPPDLLGISLTD (SEQ ID NO: 98)	Dominio intracelular
RWGLLLALRPPRWGLLLALR (SEQ ID NO: 93)	DWGLLLALDPPDWGLLLALD (SEQ ID NO: 99)	Péptido de señalización
RSTVQLVTRPPRSTVQLVTR (SEQ ID NO: 285)	DSTVQLVTDPPDSTVQLVTD (SEQ ID NO: 286)	Dominio intracelular
RLGVVFGIRPPRLGVVFGIR (SEQ ID NO: 287)	DLGVVFGIDPPDLGVVFGID (SEQ ID NO: 288)	Dominio transmembrana
RSYGVTVWRPPRSYGVTVWR (SEQ ID NO: 289)	DSYGVTVWDPPDSYGVTVWD (SEQ ID NO: 290)	Dominio intracelular
RSAVVGILRPPRSAVVGILR (SEQ ID NO: 291)	DSAVVGILDPPDSAVVGILD (SEQ ID NO: 292)	Dominio transmembrana
RGYLYISARPPRGYLYISAR (SEQ ID NO: 293)	DGYLYISADPPDGYLYISAD (SEQ ID NO: 294)	Dominio extracelular
RTGYLYISRPPRTGYLYISR (SEQ ID NO: 94)	DTGYLYISDPPDTGYLYISD (SEQ ID NO: 295)	Dominio extracelular

Péptido con resto constitutivo de R	Péptido con resto constitutivo de D	Localización en el receptor
RIISAWGRPPRIISAWGR (SEQ ID NO: 95)	DIISAVVGDPPDIISAVVGD (SEQ ID NO: 296)	Dominio transmembrana
RVYMIMVRPPRVYMIMVR (SEQ ID NO: 297)	DVYMIMVDPPDVYMIMVD (SEQ ID NO: 298)	Dominio intracelular
RVVGILLVRPPRVVGILLVR (SEQ ID NO: 299)	DVVGILLVDPPDVVGILLVD (SEQ ID NO: 300)	Dominio transmembrana
RAVVGILLRPPRAVVGILLR (SEQ ID NO: 301)	DAVVGILLDPPDAVVGILLD (SEQ ID NO: 302)	Dominio transmembrana
RVLGVVFRPPRVLGVVFR (SEQ ID NO: 303)	DVLGVVFGDPPDVLGVVFGD (SEQ ID NO: 304)	Dominio transmembrana
RVVFGILRPPRVVFGILR (SEQ ID NO: 305)	DVVFGILIDPPDVVFGILID (SEQ ID NO: 306)	Dominio transmembrana
RGVVGILRPPRGVVGILR (SEQ ID NO: 307)	DGVVGILDPPDGVVGILD (SEQ ID NO: 308)	Dominio transmembrana

Para EGFR2, se llevó a cabo una exploración similar que para VEGFR2. En lugar de usar el laborioso método de transferencia de Western, sin embargo, se usó un protocolo de ELISA que puede detectar ERK1/2 tanto fosforilado como total. Se identificaron 3 péptidos que redujeron de manera significativa y repetida la señalización de EGF: RWGLLLALRPPRWGLLLALR (SEQ ID NO: 93) (denominado A5, que se dirige al péptido de señalización), RTGYLYISRPPRTGYLYISR (SEQ ID NO: 94) (denominado A11, que se dirige al dominio extracelular) y RNSAWGRPPRIISAWGR (SEQ ID NO: 95) (denominado A12, que se dirige al dominio transmembrana). Los resultados se muestran en la figura 70.

10 El efecto inhibitor es significativo, aunque la inhibición es incompleta. Esto se debe probablemente a la expresión de otros EGFR en células HeLa (Masui et al., Cancer Res. 1984; 44(3): 1002-7), que también señala mediante fosforilación de ERK y no son diana de los presentes péptidos.

5.2 Aplicaciones antiinflamatorias

15 La vía del factor nuclear (NF)-kappaB tiene un papel importante en la inmunidad y se ha relacionado una actividad inadecuada de la vía de NF-kappaB con muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Múltiples mecanismos aseguran normalmente la terminación adecuada de la activación de la vía de NF-κB. En este contexto, la proteína de edición de ubiquitina intracelular A20 (también conocida como proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa o TNFAIP3) es un factor clave en la regulación de retroalimentación negativa de la señalización de NF-kappaB en respuesta a múltiples estímulos.

20 Para evaluar el potencial de los interferidores en la modulación de las respuestas inmunitarias, se decidió inhibir las proteínas implicadas en la vía de NF-κB (por ejemplo, A20) usando péptidos interferidores.

25 Ya que A20 regula la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) y los estudios genéticos recientes demuestran una clara asociación entre varias mutaciones en el locus de A20 humano y patologías inmunitarias, tales como la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, el lupus eritematoide sistémico, la psoriasis y la diabetes de tipo 1 (Vereecke et al., Trends Immunol.; 30(8):383-9, 2009), esta proteína se seleccionó para una primera prueba de principio en la modulación de la vía de NF-κB.

30 Para este fin, se determinó la cinética de la inducción de A20 en respuesta a TNF-α. Las células A549 (una línea celular epitelial de adenocarcinoma alveolar basal humano) se estimularon con 1000 UI/ml de TNF humano. A las 0, 1, 3, 6 y 8 horas después de la estimulación, se comprobó en el sobrenadante la presencia de IL-8 usando un ELISA y la presencia de IL-6 usando un bioensayo (la expresión de IL-8 e IL-6 son respuestas inducidas por NF-κB tras la estimulación con TNF). Al mismo tiempo, se lisaron las células y se detectó A20 en los lisados usando transferencia de Western.

35 Se ensayó IL-6 basándose en la respuesta proliferativa de células 7TD1 (Beyaert, Schulze-Osthoff, Van Roy y Fiers, Cytokine 1991). Brevemente, se trataron células A549 durante los tiempos indicados con TNF, se recogió el sobrenadante y se usó para tratar células 7TD1, que dependen de IL-6 para su proliferación. Como estándar, se usa una cantidad conocida de IL-6 recombinante; comparando la proliferación, se pueden extrapolar las cantidades de IL-6.

40 Los resultados se muestran en la figura 71.

La inducción de IL-8 alcanza un máximo 6 horas después de la estimulación, tiempo tras el cual también se induce

claramente la IL-6. Por lo tanto, para probar la actividad de los interferidores para A20 en la expresión de A20 y la señalización de NF- κ B, se preincubaron las células A549 durante 20h con interferidores para A20 20 μ M (disueltos en DMSO, diluido en medio asérico para que contuviese únicamente un 2% de DMSO). Después de 6h de estimulación con 1000 UI/ml de TNF, se llevaron a cabo el mismo ELISA para IL-8, el bioensayo de IL-6 y la WB de A20.

Todos los péptidos ensayados tenían la misma fórmula general X1-Y-X2-Z1-X3-Y2-X4 (es decir, n=2 sin enlazador externo), en donde los restos X son restos de R individuales. Los péptidos se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Secuencias de interferidores de A20.

N.º de interferidor	X1	Y1	X2	Z1	X3	Y2	X4
1	R	IHFVLS (SEQ ID NO: 309)	R	PP	R	IHFVLS (SEQ ID NO: 309)	R
2	R	HIFVLSN (SEQ ID NO: 310)	R	PP	R	HIFVLSN (SEQ ID NO: 310)	R
3	R	IFVLSNI (SEQ ID NO: 311)	R	PP	R	IFVLSNI (SEQ ID NO: 311)	R
4	R	FVLSNIL (SEQ ID NO: 312)	R	PP	R	FVLSNIL (SEQ ID NO: 312)	R
5	R	IIVIS (SEQ ID NO: 313)	R	PP	R	IIVIS (SEQ ID NO: 313)	R
6	R	YLMVI (SEQ ID NO: 314)	R	PP	R	YLMVI (SEQ ID NO: 314)	R
7	R	FSTLSFI (SEQ ID NO: 315)	R	PP	R	FSTLSFI (SEQ ID NO: 315)	R
8	R	IHFVLS (SEQ ID NO: 309)	R	PP	R	IIVIS (SEQ ID NO: 313)	R
9	R	HIFVLSN (SEQ ID NO: 310)	R	PP	R	YLMVI (SEQ ID NO: 314)	R
10	R	IFVLSNI (SEQ ID NO: 311)	R	PP	R	FSTLSFI (SEQ ID NO: 315)	R
11	R	IIVIS (SEQ ID NO: 313)	R		R	IHFVLSNIL (SEQ ID NO: 316)	R
12	R	YLMVI (SEQ ID NO: 314)	R		R	IHFVLSNIL (SEQ ID NO: 316)	R

Los resultados del ensayo ELISA (2 experimentos independientes) se muestran en la fig. 72. Tal como puede verse a partir de la figura, prácticamente todos los interferidores tuvieron éxito para aumentar significativamente los niveles de IL-8 tras la estimulación con TNF, una medida para la actividad de señalización de NF- κ B. Ya que A20 es una proteína citoplasmática, los péptidos interferidores necesitan entrar en las células para que sean capaces de inhibir la vía. Se obtuvieron resultados similares pero menos pronunciados cuando se probaron los mismos interferidores, donde los restos X eran todos un solo resto de D (no mostrado). Las transferencias de Western muestran una reducción de los niveles de proteína A20, pero esto fue más difícil de cuantificar y necesita una optimización adicional (datos no mostrados). Los resultados de un bioensayo de IL-6 representativo se muestran en la fig. 73 y estos son muy similares a los resultados obtenidos con el ensayo de IL-8.

Estos resultados demuestran que es factible influenciar la respuesta inmunitaria regulada por la vía de NF- κ B. En una etapa posterior, se usarán péptidos diseñados contra TNF para evaluar la inhibición de las señales inducidas por TNF. Los ejemplos de péptidos interferidores que se probarán son RGLYLIYSQVLFDPFRGLYLIYSQVLF (SEQ ID NO: 317), RGLYLIYSQVLFRRPRGLYLIYSQVLF (SEQ ID NO: 318), RGLYLIYSQVLFPPRGLYLIYSQVLF (SEQ ID NO: 319) y RGLYLIYSQVLFHPPRGLYLIYSQVLFH (SEQ ID NO: 320).

6. Aplicación en plantas

6.1 Introducción

Para probar la tecnología de interferencia *in planta*, se ha seleccionado un miembro de la vía de señalización de los brasinosteroides (BR). Los BR son hormonas esteroideas que afectan a muchos procesos celulares implicados en el crecimiento de órganos y el desarrollo de plantas, incluyendo la diferenciación vascular, la senescencia, la fertilidad masculina, la floración, la fotomorfogénesis, y la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Bajguz y Hayat (2009) Plant Physiol. Biochem 47(1): 1-8). También actúan en rasgos agrónomicamente importantes en plantas de cultivo, tales como el número de vástagos, el tamaño de la hoja y el ángulo de la hoja (Morinake Y et al (2006) Plant Physiol 141(3): 924-31). Como ejemplo, la expresión específica de tejido de las esteroles C-22 hidroxilasas, una enzima que controla los niveles de hormona BR, pueden potenciar el relleno de granos en el arroz (Wu CY et al (2008) Plant Cell 20(8): 2130-45).

En *Arabidopsis*, las BR son percibidas por las cinasas similares a receptor (RLK) de repetición rica en leucina (LRR) de la membrana plasmática INSENSIBLE A BRASINOSTEROIDE 1 (BRI1) que se activa tras la unión de BR y se asocia con la CINASA RECEPTORA 1 ASOCIADA A BRIL (BAK1) que inducen eventos de transfosforilación secuenciales mediante los cuales, BRI1 completamente activada puede fosforilar adicionalmente las CINASAS DE SEÑALIZACIÓN DE BR (BSK). Después, las BSK fosforiladas se liberan del complejo receptor y se unen a los fosfatos de SUPRESOR 1 DE BRI1 (BSU1), posiblemente potenciando su actividad. BSU1 activada inhibe a insensible a Brasinosteroide 2 (BIN2) y otras cinasas que pertenecen a la familia de glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3) desfosforilando su resto de fosfotirosina. BIN2 no fosforilada permite la acumulación de los factores de

transcripción RESISTENTE 1 AL BRASINAZOL (BZR1) Y BZP2/bri1-EMS-SUPESOR1 (BZR2/BES1) no fosforilados en el núcleo. BZR1 y BZR2/BES1 activas se unen al ADN genómico para regular la expresión del gen diana de BR, modulando de este modo el crecimiento y desarrollo de plantas.

- 5 En esta vía se ha identificado una buena supuesta vía en el regulador negativo de BR, BIN2, ya que se esperaba que interferir con este usando la tecnología de interferencia de proteínas podría dar como resultado cambios fenotípicos agronómicamente interesantes. Para este fin, se correlacionó la eficacia del silenciamiento por agregación de proteínas con las alteraciones fenotípicas observadas puntuando parámetros de crecimiento, tales como forma de la hoja y altura de la planta. Estos parámetros tienen efectos agronómicos importantes en el
10 rendimiento del cultivo, tal como se ha demostrado en mutantes de silenciamiento de la señalización de brasinosteroides de arroz que tienen mayores rendimientos en condiciones de siembra densa.

En el presente estudio, se abordaron dos cuestiones biológicas principales; en primer lugar si es posible visualizar y evaluar el fenómeno de la β -agregación en plantas y después, si es posible el uso como diana de una proteína específica de interés mediante señuelos de agregación demostrando su silenciamiento funcional.
15

6.2. Diseño de construcciones que expresan el interferidor de BIN2

Se seleccionó la cinasa similar a GSK3, BIN2, como diana adecuada en plantas debido a su localización citosólica y nuclear que podría permitir usarla como diana por los péptidos de agregación expresados (es decir, los péptidos interferidores). Se identificaron dos series de aminoácidos cortas en la secuencia de aminoácidos primaria de BIN2 (véase la figura 74a) con el algoritmo TANGO. El algoritmo predijo que estas dos secuencias de aminoácidos propensas a la beta-agregación tienen una propensión a la agregación mayor del 50%. Estos péptidos interferidores, que también se denominan en el presente documento como señuelos, abarcan las regiones de BIN2 de 44-55aa (bait44) y en el dominio de cinasa de 249-257aa (bait249). Por motivos experimentales, se decidió centrar el estudio en bait249. Para inducir la agregación de BIN2, se diseñaron por ingeniería genética varias construcciones, en donde se fusionó bait249 en C-terminal a la proteína fluorescente eGFP en vectores de expresión binaria en plantas. Estas construcciones de expresión de bait249 se han diseñado con y sin aminoácidos cargados positivamente (en el presente documento denominados como restos constitutivos); la construcción que comprende restos constitutivos se denominó "bait249R" y la construcción sin estos restos constitutivos se denominó "bait249". Esta última construcción se preparó para evaluar el papel de los restos constitutivos para potenciar la localización citosólica del señuelo expresado. Además, se ha insertado una secuencia sintética que se sabe que potencia el proceso de agregación (denominada en el presente documento como reforzador) entre el señuelo y la eGFP mediante una secuencia enlazadora (las secuencias específicas se representan en la fig. 74b). Por lo tanto, la construcción "bait249R" corresponde a una molécula interferidora en donde $n=1$, es decir, de la fórmula $X_1-Y_1-X_2-Z_1$, fusionada a restos adicionales. Tanto X_1 como X_2 son R, Y_1 es la secuencia QLVEIHKVL (SEQ ID NO: 321), Z_1 es un enlazador de aminoácidos con la secuencia KPAGAAKPGAAG (SEQ ID NO: 112), y los restos adicionales son una secuencia potenciadora de la agregación y un resto de GFP para la detección.
20
25
30
35

Para evaluar qué características bioquímicas de los péptidos agregantes eran más óptimas para lograr la formación de agregados y el direccionamiento específico, también se han diseñado diferentes variantes de bait249. Se han generado dos construcciones que expresan bait249, flanqueadas por 5-7aa que flanquean de manera natural la secuencia señuelo en la proteína BIN2, insertados o bien en una sola copia (denominada bait249NF) en repetición en tándem (denominada bait249NF_Tand). En este segundo conjunto de vectores no se insertó un potenciador de la agregación (véase la figura 74c). En estos casos, una parte de los restos flanqueantes naturales actúa como restos constitutivos. Por lo tanto, bait249NF corresponde a una molécula interferidora en donde $n=1$, es decir, de fórmula $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde X_1 es D (el último aminoácido de la secuencia flanqueante ENAVD (SEQ ID NO: 322)), X_2 es G (el primer aminoácido de la secuencia flanqueante GTP TREE (SEQ ID NO: 323)), Y_1 es la secuencia QLVEIHKVL (SEQ ID NO: 321), Z_1 es un enlazador de aminoácidos con la secuencia AGSPKGAPAAKGS GA (SEQ ID NO: 324), y la molécula se fusiona a un resto de GFP para su detección a través del enlazador Z_1 . Bait249NF_Tand se construye a partir de 2 unidades de bait249NF (es decir, $n=2$ o $X_1-Y_1-X_2-Z_1-X_3-Y_2-X_4-Z_2$ con $X_1=X_3$, $X_2=X_4$, $Y_1=Y_2$, $Z_1=Z_2$ y fusión al resto de GFP a través del enlazador Z_2).
40
45
50

6.3. Visualización de la agregación de bait249 mediante expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*

Se comprobó la capacidad de los diferentes señuelos para inducir la formación de agregados en plantas con un microscopio confocal de barrido láser (CLSM) en un sistema de expresión transitoria que sobreexpresa los señuelos mediante infiltración mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se observó que la ausencia de restos constitutivos en el vector de bait249 indujeron fuertemente la formación de cuerpos de inclusión insolubles en lugar de expresión citosólica (tal como se evidencia en la figura 75a). Por el contrario, bait249R indujo una agregación perinuclear citosólica fuerte, tal como se mostró claramente comparando el efecto con el patrón de localización de GFP libre (véase la figura 75b,e). La señal detectada fue más uniforme que para bait249 y no se identificaron cuerpos de inclusión, lo que indica la importancia de los restos constitutivos. El segundo conjunto de construcciones usado en este estudio mostró una clara presencia de agregados perinucleares en ambas versiones, en donde la construcción que expresa el señuelo en repetición en tándem (bait249NF_Tand) fue la construcción agregante más fuerte, tal como se observó mediante la CLSM (véase la figura 75c,d). En estas construcciones,
55
60
65

parece que los aminoácidos flanqueantes adicionales (incluyendo los constitutivos), añadidos a las secuencias de señuelo, desempeñan un papel importante para lograr la agregación citosólica.

6.4. Bait259 se colocaliza e interactúa físicamente con la proteína diana BIN2 en células de *N. benthamiana*

Se ha llevado a cabo un ensayo de colocalización transitoria en hojas de *N. benthamiana* de BIN2 y bait249 para tener una indicación rápida del direccionamiento del señuelo y su tendencia a la coagregación frente a su diana. Para esto, se inyectó a las hojas conjuntamente cepas de *A. tumefaciens* que expresan la versión más fuertemente agregante de bait249 observada a nivel de CLSM, es decir, bait249NF_Tand fusionado a una proteína fluorescente RFP y la proteína BIN2 fusionada a eGFP. La expresión de bait249NF_Tand se indujo 24 horas antes de la posterior evaluación por microscopía de fluorescencia. El análisis por CLSM de las hojas 4-5 días después de la inyección mostró una clara colocalización entre el señuelo y la diana, evidenciada tanto por patrones de expresión solapantes como por los coeficientes de colocalización de Mander calculados, con valores mayores de 0,8. La formación de agregados citosólicos de colocalización también se evaluó en microscopía de fluorescencia (Véase la figura 76).

En una etapa posterior, tras la confirmación por CLSM de la colocalización y la agregación de proteína entre las proteínas señuelo-GFP y la diana de BIN2, también se evaluó su interacción física estable en un sistema de expresión transitorio mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP). Para evitar la ausencia de un anticuerpo específico para BIN2, la proteína diana se fusionó en el extremo N-terminal a un marcador inmunológico de hemaglutinina (HA). Después, en hojas de *N. benthamiana* se coinyectaron con cepas de *Agrobacterium* transformadas con diferentes vectores de expresión bait249-GFP y se expresó BIN2-HA bajo el control del promotor 35S. Se probaron tanto bait249 con y sin restos constitutivos (y con potenciador de la agregación) como bait249 individual y en repeticiones en tándem (sin potenciador). El experimento de co-IP se llevó a cabo mediante el despliegue de los señuelos marcados con GFP mediante perlas de anti-GFP acoplado a agarosa y la transferencia de Western posterior se logró con un anticuerpo monoclonal anti-HA. Se usaron diferentes controles negativos: i) para evaluar la unión inespecífica de GFP a las perlas, se coinyectó un vector que codifica GFP libre con BIN2HA; ii) para evaluar la unión inespecífica del potenciador sintético a las perlas, se diseñó un vector que codifica únicamente el potenciador y la secuencia enlazadora fusionada a GFP y se coinyectó con BIN2-HA, iii) para evaluar la unión inespecífica de la proteína BIN2 o del marcador de HA a las perlas, se inyectó la construcción BIN2-HA sola; y iv) también se usó un extracto de planta de tipo silvestre como control negativo adicional. El experimento de co-IP indicó una interacción positiva para cualquier versión de bait249 probado con BIN2, de este modo demostrando convincentemente que el señuelo y la diana pueden interactuar a través de la formación de una interacción bioquímica específica, es decir, una agregación mediada por β -lámina cruzada (véase la figura 77). Este resultado confirmó lo que se había observado en los ensayos de colocalización, generando de este modo una prueba de concepto de que se produce una interacción física entre los dos compañeros en un sistema *in vivo*.

6.5. Evaluación de la eficacia de la agregación de proteína en plantas transgénicas de *Arabidopsis*

Después de la transformación de las diversas construcciones de expresión de bait249 marcadas con GFP, también se controló la eficacia de la agregación en plantas de *Arabidopsis* transgénicas.

La evaluación de los complejos de agregador inducidos se determinó mediante obtención de imágenes de la proteína fluorescente GFP en el microscopio de CLSM en cada línea homocigota.

Se observó que las líneas que expresan 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP mostraron el patrón de expresión de GFP subcelular más fuerte, con una clara agregación perinuclear en diferentes tejidos de plántulas (cotiledones, peciolo, hipocótilo y raíz) (véase la figura 78a-d, e-h).

Por el contrario, para las plantas de *Arabidopsis* que comprenden la construcción 35S::bait249-GFP, la ausencia de restos constitutivos impidió la expresión de cualquier agregado localizado en el citosol en células de *Arabidopsis*, lo que da lugar a una expresión más débil de la proteína indicadora y a la formación de cuerpos insolubles de forma redondeada en las células, como también se observó en hojas de *Nicotiana* transformadas de manera transitoria. El patrón de expresión de 35S::bait249NF-GFP fue más débil que para el señuelo en tándem (véase la figura 79a-h). Por los motivos anteriormente mencionados, no se han tomado en consideración las construcciones 35S::bait249-GFP y 35S::bait249NF-GFP para análisis funcionales adicionales.

Para investigar a nivel subcelular el patrón de localización de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP en células de *Arabidopsis*, se llevó a cabo una microscopía electrónica de transmisión en plántulas 8 días después de la siembra (D.D.S) que expresan de manera estable estas construcciones. El patrón de localización citosólico de señuelo-GFP de las líneas seleccionadas para análisis posteriores se ha confirmado mediante experimentos de marcaje con inmunoro. En esta estrategia, el marcaje de los hipocótilo y las células de la raíz en la línea de 35S::bait249R-GFP con un anticuerpo anti-GFP dio como resultado una localización subcelular específica del señuelo, principalmente en el citosol de las células que pertenecen al área de elongación de la raíz. Las proteínas agregantes parecían estar dispuestas en estructuras tanto fibrilares como en aglomeraciones agrupadas que indican que los agregados pueden adoptar diferentes formas en las células (figura 80a-c). Los apilamientos de Golgi estaban libres de partículas de oro (véase la figura 80c) que en cambio, parecen ser más abundantes en estructuras

similares a membrana (es decir, el ER) (figura 80b). También fue rara de encontrar la presencia de proteína citosólica bait249RGFP. Para 35S::bait249NF_Tand-GFP se apreció una localización citosólica y perinuclear masiva en las células de empalizada en los cotiledones y en las células del área de alargamiento de la raíz y no se detectaron formas peculiares de los complejos agregadores (figura 80d-e).

5 La confirmación bioquímica de los niveles de proteínas agregadoras se ha evaluado para cada línea de *Arabidopsis* transformada mediante electroforesis PAGE nativa y análisis de transferencia de Western posterior con un anticuerpo monoclonal anti-GFP (véase la figura 81a).

10 Por lo tanto, se ha analizado adicionalmente la naturaleza bioquímica de los agregados mediante espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) después de su inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo anti-GFP. Los espectros de FT-IR mostraron claramente dos picos en la absorbancia a valores de λ de 1616 y 1680 que indica un alto contenido de agregados de β -láminas en las líneas de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249-GFP, más allá de su diferente patrón de localización subcelular (véase la figura 81b). Para las líneas 35S::bait249NF-GFP y
15 35S::bait249NF_Tand-GFP se detectó un ligero aumento en los valores de absorción de 1616 y 1680, lo que indica un contenido de β -lámina en el material inmunoprecipitado, aunque en menor medida que para las líneas analizadas previamente (figura 81c).

20 6.5.1 Fenotipo de plantas de *Arabidopsis* transgénicas

Las líneas homocigotas que expresan bait249 se analizaron adicionalmente tanto *in vitro* como en el suelo respecto de la aparición de fenotipos que demuestran que se estaba produciendo un silenciamiento de BIN2. Las plántulas transgénicas de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP, cultivadas verticalmente durante 8 días *in vitro*, tuvieron raíces e hipocótilos más largos que la línea no transformada Col-0; esta observación también se confirmó
25 mediante cuantificación con el programa informático ImageJ (figura 82a). La evaluación estadística llevada a cabo indicó una significación estadística entre Col-0 y las líneas transgénicas. Las plantas transgénicas de un mes de edad cultivadas en suelo también dieron como resultado individuos más grandes respecto de Col-0 (figura 82a). Las plántulas transgénicas para 35S::bait249-GFP y 35S::bait249NF-GFP no mostraron diferencia fenotípica alguna con Col-0 ni *in vitro* ni en condiciones en suelo y no se incluyeron en los análisis posteriores.

30 En una etapa posterior, para proporcionar pruebas adicionales de que la función de BIN2 se ve afectada por su agregación específica, se examinaron las líneas 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF-GFP respecto de su resistencia al inhibidor de la biosíntesis de brasinosteroides, brasinazol (BRZ). Como control positivo, se usaron el triple mutante de silenciamiento en BIN2 y sus dos homólogos próximos (atsk22 y atsk23) (Vert G y Chory J (2006) Nature 441 (7089): 96-100). Se esperaba que en caso de que se viese afectada la función de BIN2, podría dar como resultado plantas que fuesen al menos parcialmente resistentes al brasinazol (obsérvese que el triple mutante (Vert G y Chory J (2006) Nature 441 (7089): 96-100) es resistente al brasinazol. De hecho, se podría demostrar que las líneas transgénicas demostraron una resistencia parcial al inhibidor brasinazol, cuantificada mediante la longitud del hipocótilo (véase la figura 82b).

40 6.5.2 Cambios en la expresión génica en plantas de *Arabidopsis* transgénicas

En un análisis por PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) en la expresión génica relacionada con BR de *DWF4* y *CPD*, se demostró una reducción en el nivel de expresión de *DWF4* en las dos líneas agregadoras. En el caso de la expresión génica de *CPD*, solo se observó un efecto para 35S::bait249NF_Tand:GFP, lo que indica una inhibición de retroalimentación y por lo tanto una señalización de BRs activada (véase la figura 83a). Por consiguiente, el análisis de los niveles de expresión relativos de un factor de transcripción sensible a BR de la familia de NAC mostró una expresión ligeramente aumentada para la construcción 35S::bait249NF_Tand:GFP (véase la figura 83a).

50 Aparte de los genes relacionados con BR, también se controló el efecto de la expresión de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP en líneas de *Arabidopsis* transgénicas en la inducción de la expresión de proteínas chaperonas. Curiosamente, las dos líneas agregadoras, pero en particular la planta transgénica que expresa bait249 en repetición en tándem (35S::bait249NF_Tand-GFP) mostró mayores niveles de expresión (inducidos) de los genes *HSP70*, *HSP90-1*, *HSP101*, *HSC70-1*, *HSC70-2* y *HSC70-3* genes (véase la figura 83b).

55 6.5.3 Evaluación morfológica de plantas de *Arabidopsis* transgénicas

Además, se llevó a cabo una evaluación morfológica a nivel de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las líneas transgénicas para controlar un posible efecto citotóxico de las construcciones agregadoras a nivel subcelular.
60 Con esta estrategia, no pudieron observarse alteraciones peculiares en el tamaño y las formas de células y orgánulos subcelulares en diferentes tejidos de la línea 35S::bait249R-GFP (véase la figura 84). Ocasionalmente, pudo observarse una cantidad mayor de plastoglobulos en los cloroplastos de la línea transgénica. Este último fenómeno es normalmente una indicación del estrés que en el presente caso, también puede estar causado por las condiciones de crecimiento *in vitro* sobre mallas de nailón. La evaluación por TEM también se lleva a cabo en la
65 línea homocigota que expresa bait249 en repeticiones en tándem sin potenciador de la agregación.

Para evaluar la colocalización de la proteína diana y el señuelo en líneas de *Arabidopsis* transformadas de manera estable, se pretendió visualizar la colocalización entre 35S::BIN2-GFP con la variante de agregador fuertemente expresada bait249NF_Tand fusionada a la proteína fluorescente tagRFP expresada bajo el control de un promotor inducible (pMDC::bait249NF_Tand-RFP). Para este fin, se supertransformó la línea con mejor expresión de 35S::BIN2-GFP con la construcción pMDC::bait249NF_Tand-RFP inducible por estradiol. Los ensayos de colocalización se llevaron a cabo en los transformantes primarios 24 horas después de la inducción de bait249NF_Tand y después se analizaron en el CLSM. El análisis confocal de plántulas transformadas 8 D.D.S. mostraron un claro patrón de localización solapante del señuelo y la diana (véase la figura 85). La intensidad de la colocalización observada también se cuantificó con un programa informático *ad hoc* (ImageJ MBF) que proporcionó coeficientes de Mander próxima a 1 para todas las imágenes procesadas, lo que significa que se había producido una alta colocalización entre el señuelo y la proteína diana.

En cuanto a los cambios morfológicos, curiosamente, un experimento preliminar mostró que la expresión de la construcción en tándem bait249 rescata el fenotipo del mutante bri1-5. Se espera que la reducción de la expresión de BIN2 rescate el fenotipo mutante bri1-5 (Li y Nam, Science 295:1299-1301,2002).

6.6 Materiales y métodos para los ejemplos en plantas

6.6.1. Clonación del agregador bait259 en vectores Gateway compatibles con plantas

Mediante el uso de la herramienta de predicción TANGO (<http://tango.switchlab.org/>), se seleccionaron inicialmente dos péptidos agregadores que se dirigían a dos regiones señuelo diferentes (44-55aa: RVVGTGSFGIVFK (SEQ ID NO: 325); 249-257aa: QLVEIHKVL (SEQ ID NO: 321)) en la proteína BIN2. Para la región BIN2 249-257aa, las construcciones agregadoras se diseñaron tanto con (bait249R: RQLVEIHKVLR (SEQ ID NO: 326)) como sin (bait249: QLVEIHKVL (SEQ ID NO: 321)) restos constitutivos flanqueantes, representados por restos de arginina cargados positivamente.

Las secuencias señuelo respectivas se fusionaron en C-terminal a una secuencia sintética de potenciador de la agregación (QWQNSTLIVLQNSTVIFEQNSTVIFEQN (SEQ ID NO: 327)) mediante análisis PCR, introduciendo una secuencia de enlazador flexible KPAGAAKPGAAG (SEQ ID NO: 112).

Usando el razonamiento de comprobar con modificaciones de aminoácidos señuelo podría dar lugar a un mejor direccionamiento a la proteína BIN2, se generaron otros dos vectores que expresan bait249. Bait249 se modificó mediante la adición de 5-7aa que flanquean de manera natural la región de 249-257aa en BIN2 (bait249NF: ENAVDQLVEIHKVLGTPTREE (SEQ ID NO: 328)), así como 6 aminoácidos (MADDKE (SEQ ID NO: 329)) correspondientes al comienzo de la secuencia de proteína de BIN2. La secuencia del enlazador peptídico se ha cambiado a AGSPKGAPAAKGSQA (SEQ ID NO: 324) y se ha eliminado la secuencia potenciadora. En una construcción, se ha insertado el señuelo en repetición en tándem (bait249NF_Tand: ENAVDQLVEIHKVLGTPTREEENAVDQLVEIHKVLGTPTREE (SEQ ID NO: 330)). Las secuencias de ADN clonadas se clonaron mediante Gateway en vectores de entrada pDONR221. Después de confirmar la secuencia, se transfirieron los insertos al vector de destino pK7WG2,0 (Karimi et al. 2007) para generar vectores binarios de plantas que contenían el promotor 35S y la secuencia heteróloga fusionada en C-terminal al marcador fluorescente de eGFP. También se clonó bait249NF_Tand en un vector pMDC-m13GW de Gateway que contenía un promotor inducible por estradiol (Curtis y Grossniklaus 2003) y la secuencia heteróloga se ha insertado en C-terminal fusionada a la proteína fluorescente tagRFP (pMDC::bait249NF_Tand-tagRFP). El vector de 35S::BIN2-HA se diseñó usando el vector de destino pKWG2,0 para generar vectores binarios de plantas que contenían el promotor 35S y la secuencia heteróloga que se fusionó en C-terminal mediante recombinación de homólogos a un marcador fluorescente de HA.

6.6.2. Materiales de plantas y condiciones de crecimiento

Se cultivaron plantas de *N. benthamiana* directamente en suelo sometidas a un fotoperiodo de 16L /8O a 21°C durante 45 días y se infiltraron antes de la floración.

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* L. (Heyhn.) (ecotipo Columbia, Col-0) se estratificaron durante 2 días a 4°C y se germinaron en placas cuadradas en medio de media fuerza de Murashige y Skoog (MS) (Duchefa) que contenía sacarosa al 1% y azúcar al 0,8%, pH 5,9, a 22°C con un ciclo de luz-oscuridad de 16 h/8 h con una intensidad lumínica de 80 a 100 mE m⁻² s⁻¹ suministrada mediante fluorescentes de blanco frío (Spectralux Plus 36W/840; Radium) salvo cuando se indicó. Las plántulas cultivadas *in vitro* durante 21 días se transfirieron a suelo en la sala de crecimiento con condiciones similares de luz y temperatura. En este estudio se usó la siguiente línea mutante: triple mutante bin2-3/atsk22/atsk23 (Vert y Chory 2006). Las líneas transgénicas previamente descritas usadas en el estudio son: pBIN2::BIN2-GFP y 35S::BIN2-GFP (Vert y Chory, 2006). El brasinazol (BRZ) se adquirió de TCI EUROPE N.V. (Bélgica), 24-epibrasinolida (BL) de Fuji Chemical Industries (Japón). Se indujo la expresión de pMDC::bait249NF_Tand-RFP añadiendo o infiltrando estradiol 20 µM (Sigma) durante 24h.

6.6.3. Transformación de plantas

Para generar plantas de *A. thaliana* transgénicas estables, se transformaron las construcciones diseñadas en la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*. Después, se usaron las suspensiones de las cepas bacterianas transformadas para empapar capullos florales de tipo silvestre de *A. thaliana* Col-0. Los transformantes primarios se seleccionaron germinando las semillas de las flores transformadas sobre medio selectivo de antibiótico. Mediante análisis de segregación 3:1 de la siguiente generación, se aislaron líneas celulares transgénicas homocigotas adicionales.

Para las agroinfiltraciones, se inyectó en hojas de *N. benthamiana* la cepa de *A. tumefaciens* C58C1(pCH32) transformada con los vectores 35S::bait249R-GFP, 35S::bait249-GFP, 35S::bait249NF-GFP, 35S::bait249NF_Tand-GFP, pMDC:bait249NF_Tand-RFP junto con 35S::P19, que codifica la proteína inhibidora del silenciamiento p19 procedente del virus *Tomato Bushy Stunt* (Voinnet et al. 2003).

Las cepas se usaron para infiltrar conjuntamente, con una sola jeringuilla sin aguja, el lado abaxial de hojas de *N. benthamiana* siguiendo un protocolo previamente publicado con modificaciones menores (English et al. 1996). Brevemente, se cultivaron bacterias durante una noche a 28°C en medio YEB que contenía ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 10 mM a pH 5,5 y acetosiringona 20 µM. A una densidad óptica (D.O.) de 0,8 se sedimentaron las bacterias, se resuspendieron en MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 100 µM y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 horas antes de la infiltración.

6.6.4. Obtención y análisis de imágenes

Se tomaron imágenes de las plántulas en un microscopio confocal de barrido láser (Olympus FluoView 1000) con una lente de inmersión en agua de 20X o 60X, NA1.2. El análisis de las imágenes se efectuó con el programa informático FluoView FV10-ASW. Para los experimentos de localización, se efectuaron los cálculos del coeficiente de solapamiento de Mander con el programa informático ImageJ MBF.

6.6.5. Fijación de tejidos y marcaje inmunológico para microscopía electrónica

Para los estudios morfológicos, los fragmentos (1-2 mm²) de cotiledones, hipocótilos y raíces de plántulas de 35S::bait249R-GFP y 35S::bait249NF_Tand-GFP 8 días después de la siembra (D.D.S.) se sumergieron en solución fijadora de paraformaldehído al 3 % y un 2,5 % de glutaraldehído y se fijó posteriormente en OsO₄ al 1% con K₃Fe(CN)₆ al 1,5% en tampón de cacodilato de Na 0,1 M, pH 7,2. Después, se deshidrataron las muestras mediante una serie graduada de etanol, induciendo una tinción en bruto con acetato de uranilo al 2% en la etapa de etanol al 50% seguido de su inclusión en resina de Spurr. Se efectuaron secciones ultrafinas usando un ultramicrotomo (Leica EM UC6) y se tiñeron después en un dispositivo Leica EM AC20 durante 40 min en acetato de uranilo a 20 °C y durante 10 min en la tinción posterior a 20 °C.

Las rejillas se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japón) que funcionaba a 80 kV.

Para la detección inmunocitoquímica, los fragmentos (1-2 mm²) de cotiledones, hipocótilos y raíces de plántulas de 35S::bait249R-GFP u 35S::bait249NF_Tand-GFP 8 D.A.S. plántulas, se sumergieron en una solución fijativa de paraformaldehído al 2,5 % y glutaraldehído al 0.3% en tampón de cacodilato de Na 0,1 M, pH 7,2. Las muestras se deshidrataron mediante una serie graduada de etano y se infiltraron por etapas a lo largo de 3 d a 4°C en LR-White, de alto grado (London Resin), seguido de su inclusión en cápsulas. La polimerización se efectuó mediante iluminación UV durante 24 h a 4°C, seguida de 16 h a 60°C. Se cortaron secciones ultrafinas de color de interferencia de oro con un ultramicrotomo (Leica EM UC6) y se recogieron sobre rejillas de ranura de cobre recubiertas con formvar. Todas las etapas de inmunomarcaje se llevaron a cabo en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Las rejillas se flotaron boca abajo sobre 25 µl de solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 5% (p/v) (BSA), durante 30 min seguido de lavado cinco veces durante 5 min cada vez con BSA al 1% en PBS. La incubación en una dilución 1:50 (BSA al 1% en PBS) de anticuerpos primarios de conejo anti-GFP (AbCam) durante 60 minutos fue seguida de lavado cinco veces durante 5 min cada vez con BSA al 0,1% en PBS. Las rejillas se incubaron con PAG 10 nM, dilución 1:60 (BSA al 1% en PBS) (Cell Biology, Universidad de Utrecht, Países Bajos) y se lavaron dos veces durante 5 min cada vez con BSA al 0,1% en PBS, PBS y agua doble destilada. Las secciones se tiñeron posteriormente en un dispositivo Leica EM AC20 durante 40 min en acetato de uranilo a 20°C y durante 10 min en citrato de plomo a 20°C. Las rejillas se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (Jeol Ltd., Tokio, Japón) que funcionaba a 80 kV.

6.6.6. Electroforesis y transferencia de Western

Las proteínas solubles totales (TSP) se extrajeron de plántulas de *Arabidopsis* 8 D.D.S. o de fragmentos de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* se molieron en un mortero y se enjuagaron con suero salino tamponado con fosfato 0,01 M (PBS; Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2), añadidas a inhibidores de proteasas (Complete® sin EDTA, Roche, Alemania). Después, se centrifugaron los homogeneizados a 20.000 x g durante 20' a 4°C. Los sobrenadantes se cuantificaron respecto del contenido de proteínas con el ensayo Bradford

(Micro Assay kit, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.).

El experimento de co-inmunoprecipitación se ha llevado a cabo usando perlas anti-GFP acopladas a agarosa (Chromotek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Los extractos de proteína completos o los productos IP se fraccionaron mediante SDS-PAGE (BioRad) o BN-PAGE (sistema NativePAGE, Invitrogen) siguiendo los manuales del producto. Para la SDS-PAGE, se desnaturalizaron aproximadamente 60 µg de TSP a 95 °C durante 10 min en presencia de SDS al 1% y DTT 0,1M y después se fraccionaron mediante geles de SDS-PAGE al 10%,12% o 15% (p/v) en tampón de ejecución de TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%). Las membranas se bloquearon durante una noche con leche desgrasada al 5% (p/v) en PBS a 4 °C antes de la inmunotransferencia.

15 Para BN-PAGE, se añadió el extracto de proteína con glicerol al 20% y Coomassie G-250 5 mM antes de cargarla sobre gradientes de Bis-Tris Novex al 3-12%. La electroforesis en gel se llevó a cabo en un tampón de ejecución que contenía BisTris 50 mM y tricina 50 mM (más Coomassie G-250 al 0,004% en tampón catódico) sometida a un voltaje fijo (100 V) a 21 °C durante 120 min. Las proteínas se transfirieron sobre membranas de fluoruro de polivinilideno y se tiñeron con Coomassie G-250 para mostrar marcadores de peso molecular (NativeMark, Invitrogen). Después de la fijación con ácido acético al 8% durante 20 min, se secaron al aire las membranas de fluoruro de polivinilideno y se destiñeron con metanol al 100%. Las membranas se bloquearon durante una noche con BSA al 4% en TBS a 4 °C antes de la inmunotransferencia.

20 Para detectar BIN2 unido a HA o bait249, bait249R, bait249NF, bait249NF_Tand marcados con GFP sobre la membrana, los anticuerpos primarios (de rata anti-HA, Roche; anti-GFP de ratón, Living Colors) se han diluido a 1:1.000 o 1:5.000, respectivamente, en PBS que contenía Tween-20 al 0,1% (PBS-T) y un 3% (p/v) de leche desgrasada y se incubó durante 1 h a TA. Después de cuatro enjuagues con PBS-T, la membrana se tiñó con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare) o de IgG de oveja anti-ratón (GE Healthcare) y se visualizaron con un sistema de luminiscencia electroquímica.

6.6.7. qRT-PCR

30 Se extrajo ARN de plántulas completas 8 D.A.S. tratadas como se ha indicado en medio 0,5MS y el ARN se extrajo usando el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-100. Se preparó ADNc de poli(dT) a partir de 1 µg de ARN total con la transcriptasa inversa iScript (Biorad). La PCR se llevó a cabo en placas de reacción de 384 pocillos, que se calentaron durante 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturalización durante 10 s a 95°C e hibridación y extensión durante 15 s a 60°C y 72°C, respectivamente. Las cuantificaciones de la diana se llevaron a cabo con pares de cebador específicos listados en la tabla 20. Todas las PCR se llevaron a cabo en tres repeticiones técnicas y se usaron al menos dos repeticiones biológicas usadas para cada muestra. Para el análisis de expresión de chaperonas, se adquirieron tripletes de cebadores Taqman de Integrated DNA Technologies (IDT). La qRT-PCR se llevó a cabo usando la mezcla para PCR en tiempo real rápida de Applied Biosystems en una máquina iQ5 de Biorad con detección del fluoróforo Fam. Los niveles de expresión relativos se normalizaron a los niveles de expresión de CDKA y EF.

Tabla 20: Cebadores usados para el análisis por qRT-PCR

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia
DWF4FOR	331	GTGATCTCAGCCGTACATTTGGA
DWF4REV	332	CACGTGCAAAAACCTACCACTTCCT
CPDFOR	333	GAATGGAGTGATTACAAGTC
CPDREV	334	GTGAACACATTAGAAGGGCCTG
NACFOR	335	CTCATTTGCCAATCCTGTATC
NACREV	336	GCACTGAGATGCGACATCTTG
HSP70FOR	337	TGACTCTTATCCGCTTGAACAG
HSP70 REV	338	TCCTACGTTGCTTTCACTGAC
HSP90-1FOR	339	GTGGTTCCTTCACTGTCACTAG
HSP90-1REV	340	TTCACCAAGTCTTTGAGTCTCC
HSP101FOR	341	TGAAAGGAAGAGGATGCAGC
HSP101REV	342	TGTATTTTCATCGTGAGAGGCTG
HSC70-1FOR	343	GCTATTCTCAGCGGTGAAGG
HSC70-1REV	344	TTCTCGTCTTGGATGGTGTTC
HSC70-2FOR	345	GAAACAGAACCACTCCCTCG

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia
HSC70-2 REV	346	CCAATCAACCTCTTTGCATCG
HSC70-3FOR	347	AACAGAACCACACCGTCTTAC
HSC70-3REV	348	ACCAATCAACCTCTTCGCATC
CDKAFOR	349	ATTGCGTATTGCCACTCTCATAGG
CDKAREV	350	TCCTGACAGGGATACCGAATGC
EFFOR	351	CTGGAGGTTTTGAGGCTGGTAT
EFREV	352	CCAAGGCTGAAAGCAAGAAGA

6.6.8. Espectroscopía FT-IR

5 La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier se ha llevado a cabo en un espectrómetro Tensor 37 FT-IR equipado con una celda BioATR II (Bruker) como se ha indicado anteriormente (Xu et al.). Brevemente, se enfrió el detector con nitrógeno líquido y se purgó la celda Bio-ATR II mediante un flujo continuo de aire seco para minimizar el vapor de agua que podría interferir con los resultados. Antes y después de cada medición, se lavó el cristal de la celda de ATR con etanol y agua. Las muestras se midieron contra el fondo compuesto de cristal cubierto con tampón.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW
 VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL
 15 KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.LEUVEN R&D
 UNIVERSITEIT GENT

<120> Moléculas y métodos para la inhibición y detección de proteínas

20

<130> JSC/PRO2/369

<150> EP 11157842.3
 <151> 11-03-2011

25

<150> US 61/451.855
 <151> 11-03-2011

30

<150> US 61/487.595
 <151> 18-05-2011

<150> EP 11176725.7
 <151> 05-08-2011

35

<160> 352

<170> PatentIn versión 3.5

40

<210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 1

Leu Gln Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Val Ala Thr Ala
 1 5 10 15

Lys

50

<210> 2
 <211> 883

ES 2 679 995 T3

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 2

5

Met Leu Gln Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Ala Lys Thr Ile Thr Gly Val Phe Asn Ser Phe Asn Ser Leu Thr Trp
20 25 30

Ser Asn Ala Ala Thr Tyr Asn Tyr Lys Gly Pro Gly Thr Pro Thr Trp
35 40 45

ES 2 679 995 T3

Asn Ala Val Leu Gly Trp Ser Leu Asp Gly Thr Ser Ala Ser Pro Gly
 50 55 60

Asp Thr Phe Thr Leu Asn Met Pro Cys Val Phe Lys Phe Thr Thr Ser
 65 70 75 80

Gln Thr Ser Val Asp Leu Thr Ala His Gly Val Lys Tyr Ala Thr Cys
 85 90 95

Gln Phe Gln Ala Gly Glu Glu Phe Met Thr Phe Ser Thr Leu Thr Cys
 100 105 110

Thr Val Ser Asn Thr Leu Thr Pro Ser Ile Lys Ala Leu Gly Thr Val
 115 120 125

Thr Leu Pro Leu Ala Phe Asn Val Gly Gly Thr Gly Ser Ser Val Asp
 130 135 140

Leu Glu Asp Ser Lys Cys Phe Thr Ala Gly Thr Asn Thr Val Thr Phe
 145 150 155 160

Asn Asp Gly Gly Lys Lys Ile Ser Ile Asn Val Asp Phe Glu Arg Ser
 165 170 175

Asn Val Asp Pro Lys Gly Tyr Leu Thr Asp Ser Arg Val Ile Pro Ser
 180 185 190

Leu Asn Lys Val Ser Thr Leu Phe Val Ala Pro Gln Cys Ala Asn Gly
 195 200 205

Tyr Thr Ser Gly Thr Met Gly Phe Ala Asn Thr Tyr Gly Asp Val Gln
 210 215 220

Ile Asp Cys Ser Asn Ile His Val Gly Ile Thr Lys Gly Leu Asn Asp
 225 230 235 240

Trp Asn Tyr Pro Val Ser Ser Glu Ser Phe Ser Tyr Thr Lys Thr Cys
 245 250 255

Ser Ser Asn Gly Ile Phe Ile Thr Tyr Lys Asn Val Pro Ala Gly Tyr
 260 265 270

Arg Pro Phe Val Asp Ala Tyr Ile Ser Ala Thr Asp Val Asn Ser Tyr
 275 280 285

Thr Leu Ser Tyr Ala Asn Glu Tyr Thr Cys Ala Gly Gly Tyr Trp Gln
 290 295 300

ES 2 679 995 T3

Arg Ala Pro Phe Thr Leu Arg Trp Thr Gly Tyr Arg Asn Ser Asp Ala
305 310 315 320

Gly Ser Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Thr Arg Thr Val Thr Asp
325 330 335

Ser Thr Thr Ala Val Thr Thr Leu Pro Phe Asp Pro Asn Arg Asp Lys
340 345 350

Thr Lys Thr Ile Glu Ile Leu Lys Pro Ile Pro Thr Thr Thr Ile Thr
355 360 365

Thr Ser Tyr Val Gly Val Thr Thr Ser Tyr Ser Thr Lys Thr Ala Pro
370 375 380

Ile Gly Glu Thr Ala Thr Val Ile Val Asp Ile Pro Tyr His Thr Thr
385 390 395 400

Thr Thr Val Thr Ser Lys Trp Thr Gly Thr Ile Thr Ser Thr Thr Thr
405 410 415

His Thr Asn Pro Thr Asp Ser Ile Asp Thr Val Ile Val Gln Val Pro
420 425 430

Ser Pro Asn Pro Thr Val Thr Thr Thr Glu Tyr Trp Ser Gln Ser Phe
435 440 445

Ala Thr Thr Thr Thr Ile Thr Gly Pro Pro Gly Asn Thr Asp Thr Val
450 455 460

Leu Ile Arg Glu Pro Pro Asn His Thr Val Thr Thr Thr Glu Tyr Trp
465 470 475 480

Ser Glu Ser Tyr Thr Thr Thr Ser Thr Phe Thr Ala Pro Pro Gly Gly
485 490 495

Thr Asp Ser Val Ile Ile Lys Glu Pro Pro Asn Pro Thr Val Thr Thr
500 505 510

Thr Glu Tyr Trp Ser Glu Ser Tyr Thr Thr Thr Thr Thr Val Thr Ala
515 520 525

Pro Pro Gly Gly Thr Asp Thr Val Ile Ile Arg Glu Pro Pro Asn His
530 535 540

Thr Val Thr Thr Thr Glu Tyr Trp Ser Gln Ser Tyr Thr Thr Thr Thr

ES 2 679 995 T3

Thr Glu Tyr Trp Ser Gln Ser Phe Ala Thr Thr Thr Thr Val Thr Ala
805 810 815

Pro Pro Gly Gly Thr Asp Thr Val Leu Ile Arg Glu Pro Pro Asn Pro
820 825 830

Thr Val Thr Thr Thr Glu Tyr Trp Ser Gln Pro Tyr Thr Thr Thr Thr
835 840 845

Thr Val Ile Ala Pro Pro Gly Gly Thr Asp Thr Val Ile Ile Tyr Asp
850 855 860

Thr Met Ser Ser Ser Glu Ile Ser Ser Phe Ser Arg Pro His Tyr Thr
865 870 875 880

Asn His Thr

<210> 3
<211> 1023
<212> PRT
<213> Escherichia coli

5

<400> 3

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp
1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
20 25 30

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser
35 40 45

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
50 55 60

Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro Asp
65 70 75 80

Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp
85 90 95

Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro
100 105 110

Phe Val Pro Ala Glu Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn
115 120 125

10

ES 2 679 995 T3

Ile Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp
 130 135 140

Gly Val Asn Ser Ala Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly
 145 150 155 160

Tyr Gly Gln Asp Ser Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe
 165 170 175

Leu Arg Ala Gly Glu Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser
 180 185 190

Asp Gly Ser Tyr Leu Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile
 195 200 205

Phe Arg Asp Val Ser Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp
 210 215 220

Phe Gln Val Thr Thr Leu Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu
 225 230 235 240

Glu Ala Glu Val Gln Met Tyr Gly Glu Leu Arg Asp Glu Leu Arg Val
 245 250 255

Thr Val Ser Leu Trp Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala
 260 265 270

Pro Phe Gly Gly Glu Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg
 275 280 285

Val Thr Leu Arg Leu Asn Val Glu Asn Pro Glu Leu Trp Ser Ala Glu
 290 295 300

Ile Pro Asn Leu Tyr Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Ile Glu Ala Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg
 325 330 335

Ile Glu Asn Gly Leu Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg
 340 345 350

Gly Val Asn Arg His Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp
 355 360 365

Glu Gln Thr Met Val Gln Asp Ile Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn Phe
 370 375 380

ES 2 679 995 T3

Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr Thr
 385 390 395 400
 Leu Cys Asp Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Val Asp Glu Ala Asn Ile Glu
 405 410 415
 Thr His Gly Met Val Pro Met Asn Arg Leu Thr Asp Asp Pro Arg Trp
 420 425 430
 Leu Pro Ala Met Ser Glu Arg Val Thr Arg Met Val Gln Arg Asp Arg
 435 440 445
 Asn His Pro Ser Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Gly His
 450 455 460
 Gly Ala Asn His Asp Ala Leu Tyr Arg Trp Ile Lys Ser Val Asp Pro
 465 470 475 480
 Ser Arg Pro Val Gln Tyr Glu Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr
 485 490 495
 Asp Ile Ile Cys Pro Met Tyr Ala Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe
 500 505 510
 Pro Ala Val Pro Lys Trp Ser Ile Lys Lys Trp Leu Ser Leu Pro Gly
 515 520 525
 Glu Met Arg Pro Leu Ile Leu Cys Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn
 530 535 540
 Ser Leu Gly Gly Phe Ala Lys Tyr Trp Gln Ala Phe Arg Gln Tyr Pro
 545 550 555 560
 Arg Leu Gln Gly Gly Phe Val Trp Asp Trp Val Asp Gln Ser Leu Ile
 565 570 575
 Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Asn Pro Trp Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Phe
 580 585 590
 Gly Asp Thr Pro Asn Asp Arg Gln Phe Cys Met Asn Gly Leu Val Phe
 595 600 605
 Ala Asp Arg Thr Pro His Pro Ala Leu Thr Glu Ala Lys His Gln Gln
 610 615 620
 Gln Tyr Phe Gln Phe Arg Leu Ser Gly Arg Thr Ile Glu Val Thr Ser
 625 630 635 640

ES 2 679 995 T3

Glu Tyr Leu Phe Arg His Ser Asp Asn Glu Phe Leu His Trp Met Val
645 650 655

Ala Leu Asp Gly Lys Pro Leu Ala Ser Gly Glu Val Pro Leu Asp Val
660 665 670

Gly Pro Gln Gly Lys Gln Leu Ile Glu Leu Pro Glu Leu Pro Gln Pro
675 680 685

Glu Ser Ala Gly Gln Leu Trp Leu Thr Val Arg Val Val Gln Pro Asn
690 695 700

Ala Thr Ala Trp Ser Glu Ala Gly His Ile Ser Ala Trp Gln Gln Trp
705 710 715 720

Arg Leu Ala Glu Asn Leu Ser Val Thr Leu Pro Ser Ala Ser His Ala
725 730 735

Ile Pro Gln Leu Thr Thr Ser Gly Thr Asp Phe Cys Ile Glu Leu Gly
740 745 750

Asn Lys Arg Trp Gln Phe Asn Arg Gln Ser Gly Phe Leu Ser Gln Met
755 760 765

Trp Ile Gly Asp Glu Lys Gln Leu Leu Thr Pro Leu Arg Asp Gln Phe
770 775 780

Thr Arg Ala Pro Leu Asp Asn Asp Ile Gly Val Ser Glu Ala Thr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Pro Asn Ala Trp Val Glu Arg Trp Lys Ala Ala Gly His Tyr
805 810 815

Gln Ala Glu Ala Ala Leu Leu Gln Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ala Asp
820 825 830

Ala Val Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly Lys Thr
835 840 845

Leu Phe Ile Ser Arg Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly His Gly Glu Met
850 855 860

Val Ile Asn Val Asp Val Ala Val Ala Ser Asp Thr Pro His Pro Ala
865 870 875 880

Arg Ile Gly Leu Thr Cys Gln Leu Ala Gln Val Ser Glu Arg Val Asn

ES 2 679 995 T3

				885						890						895			
Trp	Leu	Gly	Leu	Gly	Pro	Gln	Glu	Asn	Tyr	Pro	Asp	Arg	Leu	Thr	Ala				
			900					905					910						
Ala	Cys	Phe	Asp	Arg	Trp	Asp	Leu	Pro	Leu	Ser	Asp	Met	Tyr	Thr	Pro				
		915					920					925							
Tyr	Val	Phe	Pro	Ser	Glu	Asn	Gly	Leu	Arg	Cys	Gly	Thr	Arg	Glu	Leu				
	930					935					940								
Asn	Tyr	Gly	Pro	His	Gln	Trp	Arg	Gly	Asp	Phe	Gln	Phe	Asn	Ile	Ser				
945					950					955					960				
Arg	Tyr	Ser	Gln	Gln	Gln	Leu	Met	Glu	Thr	Ser	His	Arg	His	Leu	Leu				
				965					970					975					
His	Ala	Glu	Glu	Gly	Thr	Trp	Leu	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	His	Met	Gly				
			980					985					990						
Ile	Gly	Gly	Asp	Asp	Ser	Trp	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Glu	Phe	Gln				
		995					1000					1005							
Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	His	Tyr	Gln	Leu	Val	Trp	Cys	Gln	Lys					
	1010					1015					1020								

<210> 4
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

5

ES 2 679 995 T3

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala Val Cys Gly Gly Val Leu Val His
 20 25 30

Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val
 35 40 45

Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln
 50 55 60

Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp
 85 90 95

Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val
 100 105 110

Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys
 115 120 125

Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro
 130 135 140

Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys
 145 150 155 160

Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly
 165 170 175

Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 180 185 190

Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu
 195 200 205

Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His
 210 215 220

Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
 225 230 235

<210> 5
 <211> 206

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

5

Gln Thr Asp Met Ser Arg Lys Ala Phe Val Phe Pro Lys Glu Ser Asp
 1 5 10 15

Thr Ser Tyr Val Ser Leu Lys Ala Pro Leu Thr Lys Pro Leu Lys Ala
 20 25 30

Phe Thr Val Cys Leu His Phe Tyr Thr Glu Leu Ser Ser Thr Arg Gly
 35 40 45

Tyr Ser Ile Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Arg Gln Asp Asn Glu Ile Leu
 50 55 60

Ile Phe Trp Ser Lys Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Thr Val Gly Gly Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Leu Phe Glu Val Pro Glu Val Thr Val Ala Pro Val His Ile
 85 90 95

Cys Thr Ser Trp Glu Ser Ala Ser Gly Ile Val Glu Phe Trp Val Asp
 100 105 110

Gly Lys Pro Arg Val Arg Lys Ser Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Gly
 115 120 125

Ala Glu Ala Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Phe Gly Gly
 130 135 140

Asn Phe Glu Gly Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn Val Asn
 145 150 155 160

Met Trp Asp Phe Val Leu Ser Pro Asp Glu Ile Asn Thr Ile Tyr Leu
 165 170 175

Gly Gly Pro Phe Ser Pro Asn Val Leu Asn Trp Arg Ala Leu Lys Tyr
 180 185 190

Glu Val Gln Gly Glu Val Phe Thr Lys Pro Gln Leu Trp Pro
 195 200 205

<210> 6
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

ES 2 679 995 T3

<400> 6

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

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Met

5 <210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 7

Arg Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Thr Arg
1 5 10

20 <210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

25 <400> 8

Arg Leu Gln Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Ala Lys

30 <210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 9

5

Arg Lys Leu Leu Phe Asn Leu Gly Ser Arg Asn Gly Ile Val Ile Val
1 5 10 15

Ala Thr Thr Arg
20

<210> 10

<211> 22

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15

<400> 10

Arg Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Arg Gly Ser Arg Asn Gly Ile
1 5 10 15

Val Ile Val Ala Thr Arg
20

20

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 11

Arg Val Ile Gln His Ser Thr Trp Leu Arg Gly Ser Arg Val Ile Gln
1 5 10 15

His Ser Thr Trp Leu Arg
20

30

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

40

<400> 12

Arg Leu Ile Thr Leu Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ser Arg Leu Ile Thr
1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Phe Arg
20

45

<210> 13

<211> 22

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 13

Arg Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Arg Gly Ser Arg Gln Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ile Tyr Arg

20

10 <210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 14

Lys Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Lys Gly Ser Lys Asn Gly Ile
1 5 10 15

Val Ile Val Ala Thr Lys
20

25 <210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 15

Lys Val Ile Gln His Ser Thr Trp Leu Lys Gly Ser Lys Val Ile Gln
1 5 10 15

His Ser Thr Trp Leu Lys
20

35 <210> 16
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 16

ES 2 679 995 T3

Lys Leu Ile Thr Leu Leu Ser Leu Phe Lys Gly Ser Lys Leu Ile Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Phe Lys
 20

5 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 17

Lys Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Lys Gln Tyr Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ile Tyr Lys
 20

15 <210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 18

Asp Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Asp Gly Ser Asp Asn Gly Ile
 1 5 10 15

Val Ile Val Ala Thr Asp
 20

25 <210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 35 <400> 19

Asp Val Ile Gln His Ser Thr Trp Leu Asp Gly Ser Asp Val Ile Gln
 1 5 10 15

His Ser Thr Trp Leu Asp
 20

40 <210> 20
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 20

Asp Leu Ile Thr Leu Leu Ser Leu Phe Asp Gly Ser Asp Leu Ile Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Phe Asp

20

5

<210> 21
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 21

15

Asp Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Asp Gln Tyr Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ile Tyr Asp
 20

<210> 22
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 22

Glu Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Glu Gly Ser Glu Asn Gly Ile
 1 5 10 15

Val Ile Val Ala Thr Glu
 20

<210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> Secuencia de péptido

35

<400> 23

Glu Val Ile Gln His Ser Thr Trp Leu Glu Gly Ser Glu Val Ile Gln
 1 5 10 15

His Ser Thr Trp Leu Glu
 20

40

<210> 24
 <211> 22

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 24

Glu Leu Ile Thr Leu Leu Ser Leu Phe Glu Gly Ser Glu Leu Ile Thr
1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Phe Glu
20

10 <210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 25

20 Glu Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Glu Gly Ser Glu Gln Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ile Tyr Glu
20

25 <210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 26

Pro Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Gly Ser Pro Asn Gly Ile
1 5 10 15

Val Ile Val Ala Thr Pro
20

35 <210> 27
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 27

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

45 His Ser Thr Trp Leu Pro

ES 2 679 995 T3

<210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 10 <400> 28

 Pro Leu Ile Thr Leu Leu Ser Leu Phe Pro Gly Ser Pro Leu Ile Thr
 1 5 10 15

 Leu Leu Ser Leu Phe Pro
 20

 <210> 29
 <211> 21
 <212> PRT
 15 <213> artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de péptido

 <400> 29

 Pro Gln Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Pro Gly Ser Pro Gln Tyr Thr
 1 5 10 15

 Leu Leu Leu Tyr Pro
 20

 25 <210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 30

 35 Arg Phe Phe Ile Ala Leu Ser Arg Arg Gly Ser Arg Val Gln Ala Tyr
 1 5 10 15

 Leu Tyr Arg Arg
 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 45 <400> 31

ES 2 679 995 T3

Arg Trp Val Ser Met Leu Leu Arg Arg Gly Ser Arg Trp Val Ser Met
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Arg
 20

5 <210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 32

Arg Leu Phe Asn Phe Leu Lys Arg Gly Ser Arg Leu Phe Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Lys Arg

15 <210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 33

Arg Arg Trp Val Ser Met Leu Leu Arg Arg Gly Ser Arg Trp Val Ser
 1 5 10 15

Met Leu Leu Arg Arg
 20

30 <210> 34
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 34

Arg Phe Phe Ile Gly Leu Ser Arg Arg Gly Ser Arg Leu Phe Asn Phe
 1 5 10 15

Leu Lys Arg

40 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 35

Arg Arg Ile Ile Leu Phe Ile Leu Arg Pro Pro Arg Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Arg
 20

5

<210> 36
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 36

15

Arg Arg Ile Ile Leu Ser Leu Ile Arg Pro Pro Arg Leu Leu Gly Val
 1 5 10 15

Val Leu Arg Arg
 20

20

<210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 37

Arg Arg Val Leu Ser Leu Ile Leu Arg Pro Pro Arg Ile Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Arg Arg
 20

30

<210> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 38

Arg Arg Ile Ala Leu Leu Leu Ile Arg Pro Pro Arg Leu Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Val Arg Arg
 20

40

<210> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

5 <400> 39

Arg Arg Ile Leu Leu Gly Leu Ile Arg Pro Pro Arg Thr Ile Ile Gly
1 5 10 15

Leu Val Arg Arg
20

<210> 40

10 <211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> Secuencia de péptido

<400> 40

Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Ala Arg Pro Pro Arg Ile Leu Leu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Arg Arg
20

20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 41

30

Arg Arg Leu Leu Gly Leu Ile Ile Arg Pro Pro Arg Ala Ile Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Arg Arg

20

35

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

40

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 42

Arg Arg Ile Leu Gly Leu Ile Ala Arg Pro Pro Arg Ile Ala Phe Val
1 5 10 15

Ile Leu Arg Arg
20

45

ES 2 679 995 T3

<210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 10 <400> 43

 Arg Arg Ile Ile Gly Ile Ile Ala Arg Pro Pro Arg Val Leu Val Thr
 1 5 10 15

 Leu Leu Arg Arg
 20

 <210> 44
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de péptido

 <400> 44

 Arg Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
 1 5

 25
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 45
 35
 Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
 1 5 10

 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 45
 <400> 46

 Arg Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Arg
 1 5 10

 50 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 47

	Arg	Val	Pro	Ile	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg
5	1				5					10

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 48

	Arg	Val	Ile	Pro	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg
15	1				5					10

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 49

	Arg	Val	Ile	Pro	Glu	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg
30	1				5					10

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 50

	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Gln	Arg	Arg
40	1				5					10

<210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de péptido

50

<400> 51

	Pro	Ser	Val	Ile	Ile	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Ser
55	1				5					10		

<210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

60

<220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 52

Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro
1 5 10

5
<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

10
<220>
<223> Secuencia de péptido

15
<400> 53

Arg Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
1 5

20
<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

25
<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 54

Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
1 5 10

30
<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

35
<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 55

Arg Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Arg
1 5 10

40
<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

45
<220>
<223> Secuencia de péptido

50
<400> 56

Arg Val Pro Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
1 5 10

55
<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

60
<220>
<223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 57

5 Arg Val Ile Pro Trp Ser Leu Gly Asn Arg
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 58

15

Arg Val Ile Pro Glu Ser Leu Gly Asn Arg
1 5 10

<210> 59
<211> 28
<212> PRT
<213> artificial

20

<220>
<223> Secuencia de péptido

25

<400> 59

Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg Gly Ser Gly Ser Ala Pro
1 5 10 15

Ala Ala Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
20 25

30

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

35

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 60

40

Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala Arg
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

45

<220>
<223> Secuencia de péptido

50

<400> 61

Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys Arg
1 5

55

<210> 62
<211> 11
<212> PRT

ES 2 679 995 T3

<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

5 <400> 62

Arg Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Arg
1 5 10

10 <210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 63

His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
1 5 10

20 <210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia de péptido

30 <400> 64

Asn Glu Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys Asp
1 5 10

35 <210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 65

Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe
1 5 10

45 <210> 66
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

50 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 66

55 Asp Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Asp Pro Pro Asp Ala Val Gly Val
1 5 10 15

Leu Ile Gly Asp
20

ES 2 679 995 T3

5 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 10 <400> 67

 Ala Val Gly Val Leu Ile Gly
 1 5

 15 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 68

 Arg Lys Leu Leu Phe Asn Leu
 1 5

 25 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 69

 35 Arg Lys Leu Phe Phe Asn Leu
 1 5

 40 <210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 70

 Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Val
 1 5 10

 50 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 71

 60 Asn Gly Ile Val Ile Val Ala Thr Thr
 1 5

ES 2 679 995 T3

<210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 10 <400> 72

 Thr Trp Leu Cys Gly Leu Ile Thr Leu Leu Ser Leu Phe
 1 5 10

 <210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de péptido

 <400> 73

 Asn Gly Val Val Ile Val Ala Ala Thr
 1 5

 25 <210> 74
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 74

 35 **Arg Arg Leu Phe Asn Phe Leu Lys Arg Gly Ser Arg Leu Phe Asn Phe**
 1 5 10 15

 Leu Lys Arg

 <210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 40 <223> Secuencia de péptido

 <400> 75

 Leu Ala Val Val Leu Gln
 1 5

 50 <210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 76

ES 2 679 995 T3

Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn
1 5

5 <210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 77

Ala Pro Ala Ala
1

15 <210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 78

25 Arg Phe Phe Ile Gly Leu Ser Arg Arg Gly Ser Arg Ile Gln Ala Tyr
1 5 10 15

Leu Tyr Arg Arg
20

30 <210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 79

Arg Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
1 5

40 <210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 80

50 Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
1 5 10

55 <210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 679 995 T3

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 81

5

	Arg	Pro	Ile	Thr	Val	Asn	Pro	Pro	Phe	Arg
	1				5					10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

15

<400> 82

	Arg	Val	Pro	Ile	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg
	1				5					10

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 83

	Arg	Val	Ile	Pro	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg
	1				5					10

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> Secuencia de péptido

35

<400> 84

	Arg	Val	Ile	Pro	Glu	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg
	1				5					10

<210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de péptido

45

<400> 85

	Arg	Gln	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg
	1				5				

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

50

55

60

ES 2 679 995 T3

<220>
 <223> Secuencia de péptido

5 <400> 86

Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser Arg
 1 5

10 <210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 87

Arg Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Arg
 1 5 10

20 <210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 88

Arg Trp Gln Val Leu Ala Ser Asp
 1 5

30 <210> 89
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de péptido

40 <400> 89

Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala Arg Gly Ser Gly Ser Ala Pro Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala Arg
 20 25

45 <210> 90
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 90

Gly Ser Gly Ser Ala Pro Ala Ala
 1 5

55 <210> 91

ES 2 679 995 T3

<211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 91

Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg Gly Ser Gly Ser Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
 20 25

10

<210> 92
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de péptido

20

<400> 92

Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser Arg Gly Ser Gly Ser Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser Arg
 20

25

<210> 93
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 93

Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Arg Pro Pro Arg Trp Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Arg
 20

35

<210> 94
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de péptido

45

<400> 94

ES 2 679 995 T3

Arg Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Arg Pro Pro Arg Thr Gly Tyr Leu
 1 5 10 15

Tyr Ile Ser Arg
 20

5 <210> 95
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 95

Arg Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Arg Pro Pro Arg Ile Ile Ser Ala
 1 5 10 15

Val Val Gly Arg
 20

15 <210> 96
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 96

Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Asp Pro Pro Asp Val Trp Ser Tyr
 1 5 10 15

Gly Val Thr Asp
 20

25 <210> 97
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 35 <400> 97

Asp Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Asp Pro Pro Asp Ile Thr Gly Tyr
 1 5 10 15

Leu Tyr Ile Asp
 20

40 <210> 98
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 98

Asp Leu Leu Gly Ile Ser Leu Thr Asp Pro Pro Asp Leu Leu Gly Ile
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Asp
 20

5

<210> 99
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 99

15

Asp Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Asp Pro Pro Asp Trp Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Asp
 20

20

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 100

Asn Lys Leu Arg Phe Ala Phe Asn Ile Tyr Asp Ile Asp Arg Asp
 1 5 10 15

30

<210> 101
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 101

Gly Asn Gly Glu Leu Phe Ile Val Met Lys Met Met Val
 1 5 10

40

<210> 102
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de péptido

50

<400> 102

Asn Lys Leu Arg
 1

ES 2 679 995 T3

5 <210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

10 <400> 103

Asp Ile Asp Arg Asp
1 5

15 <210> 104
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

20 <400> 104

Phe Ala Phe Asn Ile Tyr
1 5

25 <210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido

35 <400> 105

Leu Phe Ile Val Met
1 5

40 <210> 106
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

45 <400> 106

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

50 <210> 107
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

55 <400> 107

Tyr Thr Leu Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Val Ala Thr Ala
1 5 10

60

ES 2 679 995 T3

5 <210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

10 <400> 108

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

15 <210> 109
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
20 <223> Secuencia de péptido

<400> 109

Met Ala Gln Trp
1

25 <210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 110

35 Ser Thr Leu Ile Val Leu
1 5

40 <210> 111
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
45 <223> Secuencia de péptido

<400> 111

Ser Thr Val Ile Phe
1 5

50 <210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

55 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 112

Lys Pro Ala Gly Ala Ala Lys Pro Gly Ala Ala Gly
1 5 10
60

ES 2 679 995 T3

5 <210> 113
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

10 <400> 113

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Ala Gln Trp Gln Asn Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Ile Val Leu Gln Asn Ser Thr Val Ile Phe Glu Gln Asn Ser
 20 25 30

Thr Val Ile Phe Glu Gln Asn Lys Pro Ala Gly Ala Ala Lys Pro Gly
 35 40 45

Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Asn Ile Tyr Arg Gly Ser Arg Leu Phe
 50 55 60

Ile Val Met Arg
 65

15 <210> 114
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

20 <400> 114

Arg Trp Val Ser Met Leu Leu Arg Arg Gly Ser Arg Val Gly Tyr Val
 1 5 10 15

Ile Ala Arg Arg
 20

25 <210> 115
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

30 <400> 115

Arg Ile Leu Leu Gly Leu Ile Arg Arg Gly Ser Arg Ile Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Ile Arg Arg
 20

<210> 116

ES 2 679 995 T3

<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 116

Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Arg Gly Ser Arg Leu Ile Gln Leu
1 5 10 15

Ile Val Ser Arg
20

10

<210> 117
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

20 <400> 117

Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Arg Gly Ser Arg Thr Thr Ile Met
1 5 10 15

Ala Ala Phe Arg
20

25 <210> 118
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 118

Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Arg Gly Ser Arg Thr Met Ala Trp
1 5 10 15

Thr Val Val Arg
20

35

<210> 119
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

45 <400> 119

ES 2 679 995 T3

Arg Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Arg Gly Ser Arg Gly Val Ser Ile
 1 5 10 15

Leu Asn Leu Arg
 20

5 <210> 120
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 120

Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser
 1 5

15 <210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 121

Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe
 1 5

25 <210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 122

Thr Met Ala Trp Thr Val Val
 1 5

35 <210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 123

Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu
 1 5

45 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>

ES 2 679 995 T3

<223> Secuencia de péptido

<400> 124

5 Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser
1 5

<210> 125

<211> 20

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15 <400> 125

Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Arg Pro Pro Arg Thr Met Ala Trp
1 5 10 15

Thr Val Val Arg
20

<210> 126

20 <211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia de péptido

<400> 126

Asp Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asp Pro Pro Asp Thr Met Ala Trp
1 5 10 15

Thr Val Val Asp
20

30

<210> 127

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 127

40

Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Arg Pro Ser Arg Thr Met Ala Trp
1 5 10 15

Thr Val Val Arg
20

<210> 128

45 <211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 128

Asp Val His Ile Tyr Tyr Leu Asp Pro Pro Asp Val His Ile Tyr Tyr
 1 5 10 15

Leu Asp

5

<210> 129
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 129

15

Arg Val His Ile Tyr Tyr Leu Arg Pro Ser Arg Val His Ile Tyr Tyr
 1 5 10 15

Leu Arg

20

<210> 130
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 130

Asp Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Asp Pro Pro Asp Asn Leu Tyr Gly
 1 5 10 15

Phe Ile Ile Asp
 20

30

<210> 131
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 131

Arg Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Arg Pro Ser Arg Asn Leu Tyr Gly
 1 5 10 15

Phe Ile Ile Arg
 20

40

<210> 132
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 132

5

Arg Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Arg Pro Pro Arg Gly Val Ser Ile
1 5 10 15

Leu Asn Leu Arg
20

<210> 133

<211> 20

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15

<400> 133

Asp Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Asp Pro Pro Asp Gly Val Ser Ile
1 5 10 15

Leu Asn Leu Asp
20

20

<210> 134

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 134

Arg Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Arg Pro Ser Arg Gly Val Ser Ile
1 5 10 15

Leu Asn Leu Arg
20

30

<210> 135

<211> 18

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

40

<400> 135

Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Arg Pro Pro Arg Gly Phe Val Tyr Phe
1 5 10 15

Val Arg

45

<210> 136

<211> 18

<212> PRT

ES 2 679 995 T3

<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

5 <400> 136

Asp Gly Phe Val Tyr Phe Val Asp Pro Pro Asp Gly Phe Val Tyr Phe
1 5 10 15

Val Asp

10 <210> 137
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 137

Arg Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Arg Pro Pro Arg Met Ala Leu Gln
1 5 10 15

Leu Phe Ile Arg
20

20 <210> 138
<211> 20
<212> PRT

25 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

30 <400> 138

Asp Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Asp Pro Pro Asp Met Ala Leu Gln
1 5 10 15

Leu Phe Ile Asp
20

35 <210> 139
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

40 <400> 139

Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Arg Pro Pro Arg Leu Ile Gln Leu
1 5 10 15

Ile Val Ser Arg
20

45 <210> 140

ES 2 679 995 T3

<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 140

Asp	Leu	Ile	Gln	Leu	Ile	Val	Ser	Asp	Pro	Pro	Asp	Leu	Ile	Gln	Leu
1				5					10					15	

10 Ile Val Ser Asp
20

<210> 141
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

20 <400> 141

Arg	Leu	Ile	Gln	Leu	Ile	Val	Ser	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Ile	Gln	Leu
1				5					10					15	

Ile Val Ser Arg
20

<210> 142
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia de péptido

30 <400> 142

Arg	Leu	Ala	Val	Thr	Trp	Trp	Asn	Arg	Pro	Pro	Arg	Leu	Ala	Val	Thr
1				5					10					15	

Trp Trp Asn Arg
20

35 <210> 143
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

45 <400> 143

ES 2 679 995 T3

Asp Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Asp Pro Pro Asp Leu Ala Val Thr
 1 5 10 15

Trp Trp Asn Asp
 20

5 <210> 144
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 144

Arg Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Pro Pro Arg Gln Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Arg
 20

15 <210> 145
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 145

Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Asp Pro Pro Asp Gln Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Asp
 20

25 <210> 146
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 35 <400> 146

Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Arg Pro Pro Arg Gly Phe Leu Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Arg

40 <210> 147
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 147

Asp Gly Phe Leu Ile Leu Gly Asp Pro Pro Asp Gly Phe Leu Ile Leu
1 5 10 15

Gly Asp

5 <210> 148
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 148

Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Arg Pro Ser Arg Gly Phe Leu Ile Leu
1 5 10 15

Gly Arg

15 <210> 149
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia de péptido

25 <400> 149

Asp Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Asp Pro Pro Asp Leu Met Val Ala
1 5 10 15

Tyr Met Leu Asp
20

30 <210> 150
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 150

Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Arg Pro Pro Arg Thr Thr Ile Met
1 5 10 15

Ala Ala Phe Arg
20

40 <210> 151
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>

ES 2 679 995 T3

<223> Secuencia de péptido

<400> 151

Asp Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Asp Pro Pro Asp Thr Thr Ile Met
1 5 10 15

5 Ala Ala Phe Asp
20

<210> 152

<211> 20

10 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15 <400> 152

Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Arg Pro Ser Arg Thr Thr Ile Met
1 5 10 15

Ala Ala Phe Arg
20

<210> 153

20 <211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia de péptido

<400> 153

Arg Leu Val Trp Met Ala Cys His Arg Pro Pro Arg Leu Val Trp Met
1 5 10 15

Ala Cys His Arg
20

30 <210> 154

<211> 20

<212> PRT

35 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 154

40 Asp Leu Val Trp Met Ala Cys His Asp Pro Pro Asp Leu Val Trp Met
1 5 10 15

Ala Cys His Asp
20

<210> 155

45 <211> 20

<212> PRT

ES 2 679 995 T3

<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

5 <400> 155

Arg Leu Val Trp Met Ala Cys His Arg Pro Ser Arg Leu Val Trp Met
1 5 10 15

Ala Cys His Arg
20

10 <210> 156
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 156

Arg Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Arg Pro Pro Arg Val Ala Phe Gly
1 5 10 15

Leu Val Cys Arg
20

20 <210> 157
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia de péptido

30 <400> 157

Asp Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Asp Pro Pro Asp Val Ala Phe Gly
1 5 10 15

Leu Val Cys Asp
20

35 <210> 158
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 158

Arg Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Arg Pro Ser Arg Val Ala Phe Gly
1 5 10 15

Leu Val Cys Arg
20

45

ES 2 679 995 T3

<210> 159
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 159

10

Arg Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Arg Pro Pro Arg Leu Gly Phe Val
1 5 10 15

Phe Thr Leu Arg
20

<210> 160
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>
<223> Secuencia de péptido

20

<400> 160

Asp Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Asp Pro Pro Asp Leu Gly Phe Val
1 5 10 15

Phe Thr Leu Asp
20

25

<210> 161
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

30

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 161

Arg Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Arg Pro Ser Arg Leu Gly Phe Val
1 5 10 15

Phe Thr Leu Arg
20

35

<210> 162
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

40

<220>
<223> Secuencia de péptido

45

<400> 162

ES 2 679 995 T3

Arg Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Arg Pro Pro Arg Ala Val Gly Val
 1 5 10 15

Leu Ile Gly Arg
 20

5 <210> 163
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 163

Arg Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Arg Pro Ser Arg Ala Val Gly Val
 1 5 10 15

Leu Ile Gly Arg
 20

15 <210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 164

Val His Ile Tyr Tyr Leu
 1 5

25 <210> 165
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 165

Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile
 1 5

35 <210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 166

Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val
 1 5

45 <210> 167
 <211> 7

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 167

10 Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile
1 5

<210> 168
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 168

20 Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Arg
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia de péptido

30 <400> 169

35 Arg Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg
1 5

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 170

45 Gly Phe Leu Ile Leu Gly Arg
1 5

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

50 <220>
<223> Secuencia de péptido

55 <400> 171

60 Leu Met Val Ala Tyr Met Leu
1 5

<210> 172
<211> 7

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia de péptido

 <400> 172

 Leu Val Trp Met Ala Cys His
 1 5
 10
 <210> 173
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 173
 20
 Val Ala Phe Gly Leu Val Cys
 1 5

 <210> 174
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 30
 <400> 174

 Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 1 5
 35
 <210> 175
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 175

 Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg Ala
 1 5 10
 45
 <210> 176
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 176
 55
 Arg Phe Phe Ile Ala Leu Ser Arg
 1 5

 <210> 177
 60 <211> 8

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 177

Arg Ile Leu Leu Gly Leu Ile Arg
 1 5

10

<210> 178
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 178

20

Thr Leu Val Val Leu His
 1 5

<210> 179
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de péptido

30

<400> 179

Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

Asp Asp Asp Lys
 20

35

<210> 180
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 180

Arg Asp Arg Asn His Pro Ser Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu
 1 5 10 15

45

Ser Gly His Gly
 20

<210> 181
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

50

<220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 181

Asp Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
 1 5 10

5

<210> 182
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 182

15

Arg Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Asp
 1 5

<210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 183

Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly
 1 5 10

30

<210> 184
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 184

Arg Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln Asp
 1 5 10

40

<210> 185
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 185

Lys Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln Asp
 1 5 10

50

<210> 186
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

55

<220>
 <223> Secuencia de péptido

60

ES 2 679 995 T3

<400> 186

Arg Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Pro
 1 5 10

5

<210> 187
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 187

15

Arg Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe His
 1 5 10

<210> 188
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 188

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser
 1 5

30

<210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 189

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala
 1 5

40

<210> 190
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de péptido

50

<400> 190

Gly Ser Pro Ser Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu
 1 5 10

55

<210> 191
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

60

<220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 191

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Ser Val Ile Ile Trp Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Asn Glu

5

<210> 192
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 192

15

Gly Ser Ala Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
 1 5 10

<210> 193
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 193

Gly Ser Glu Leu Phe Asn Phe Leu Lys Arg
 1 5 10

30

<210> 194
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 194

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Glu Leu Phe Asn Phe Leu Lys Arg
 1 5 10 15

40

<210> 195
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 195

50

Gly Ser Ala Arg Leu Phe Asn Phe Leu Arg
 1 5 10

55

<210> 196
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 679 995 T3

<220>
 <223> Secuencia de péptido

5 <400> 196

Gly Ser Asp Trp Val Ser Met Leu Leu Arg
 1 5 10

<210> 197
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 197

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Asp Trp Val Ser Met Leu Leu Arg
 1 5 10 15

20 <210> 198
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 198

30 <210> 199
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 199

Gly Ser Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu
 1 5 10

45 <210> 200
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 200

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 1 5 10 15

55 Leu Glu

<210> 201

ES 2 679 995 T3

<211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 201

10 Gly Ser Ala Arg Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Arg
 1 5 10

<210> 202
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de péptido

20 <400> 202

Gly Ser Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His
 1 5 10

<210> 203
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de péptido

30 <400> 203

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His
 1 5 10 15

35 <210> 204
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido

45 <400> 204

Gly Ser Ala Arg Thr Leu Val Val Leu His Arg
 1 5 10

<210> 205
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de péptido

55 <400> 205

Gly Ser Glu Gly Leu Phe Trp Leu Leu Val Thr Gly His Ile Pro
 1 5 10 15

60 <210> 206

ES 2 679 995 T3

<211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 206

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Glu Gly Leu Phe Trp Leu Leu Val
 1 5 10 15

10 Thr Gly His Ile Pro
 20

<210> 207
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de péptido

20 <400> 207

Gly Ser Ala Arg Leu Phe Trp Leu Leu Val Thr Gly His Ile Arg
 1 5 10 15

25 <210> 208
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 208

Gly Ser Asn Glu Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys
 1 5 10

35 <210> 209
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 209

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Asn Glu Ile Leu Ile Phe Trp Ser
 1 5 10 15

Lys

<210> 210
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 210

Gly Ser Ala Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser Arg
1 5 10

5
<210> 211
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 211

Gly Ser Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His
1 5 10

20
<210> 212
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

25
<400> 212

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
1 5 10 15

His

30
<210> 213
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 213

Gly Ser Ala Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala Arg
1 5 10

45
<210> 214
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 214

Gly Ser Glu Val Met Phe Leu Thr Val Gln Val Lys
1 5 10

55
<210> 215
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

5 <400> 215

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Glu Val Met Phe Leu Thr Val Gln
1 5 10 15

Val Lys

<210> 216

10 <211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> Secuencia de péptido

<400> 216

Gly Ser Ala Arg Val Met Phe Leu Thr Val Gln Val Arg
1 5 10

20

<210> 217

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 217

30

Gly Ser Asp Ala Phe Phe Leu His Met Leu Met Lys
1 5 10

<210> 218

35 <211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

40 <223> Secuencia de péptido

<400> 218

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Asp Ala Phe Phe Leu His Met Leu
1 5 10 15

Met Lys

45 <210> 219

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 219

ES 2 679 995 T3

Gly Ser Ala Arg Ala Phe Phe Leu His Met Leu Met Arg
 1 5 10

5 <210> 220
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 220

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Asn Arg

15 <210> 221
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 221

Gly Ala Arg Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg Gly Ser Ala Arg
 1 5 10 15

Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Arg
 20 25

30 <210> 222
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

35 <400> 222

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Leu Phe Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15

40 <210> 223
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 223

Gly Ala Arg Leu Phe Asn Phe Leu Arg Gly Ser Ala Arg Leu Phe Asn
 1 5 10 15

Phe Leu Arg

ES 2 679 995 T3

5 <210> 224
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

10 <400> 224

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Trp Val Ser Met Leu Leu
 1 5 10 15

Arg

15 <210> 225
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 225

Gly Ala Arg Trp Val Ser Met Leu Leu Arg Gly Ser Arg Trp Val Ser
 1 5 10 15

Met Leu Leu Arg
 20

25 <210> 226
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 226

35 Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 1 5 10 15

Leu Arg

40 <210> 227
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 227

ES 2 679 995 T3

Gly Ala Ser Arg Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Arg Gly Ser Arg Ile
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ile Thr Leu Arg
 20

5 <210> 228
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 228

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Thr Leu Val Val Leu His
 1 5 10 15

Arg

15 <210> 229
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 229

Gly Ala Thr Leu Val Val Leu His Arg Gly Ser Arg Thr Leu Val Val
 1 5 10 15

25 Leu His Arg

30 <210> 230
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido
 35 <400> 230

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Leu Phe Trp Leu Leu Val
 1 5 10 15

Thr Gly His Ile Arg
 20

40 <210> 231
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 231

ES 2 679 995 T3

Gly Ala Arg Leu Phe Trp Leu Leu Val Thr Gly His Ile Arg Gly Ser
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Trp Leu Leu Val Thr Gly His Ile Arg
 20 25

5 <210> 232
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 232

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser
 1 5 10 15

15 **Arg**
 <210> 233
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 233

25 Gly Ala Ser Arg Ile Leu Ile Phe Trp Ser Arg Gly Ser Arg Ile Leu
 1 5 10 15

Ile Phe Trp Ser Arg
 20

30 <210> 234
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 234

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Arg

40 <210> 235
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 235

Gly Ala Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala Arg Gly Ser Arg Gln Trp
1 5 10 15

Val Leu Thr Ala Ala Arg
20

5

<210> 236
<211> 19
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 236

15

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Val Met Phe Leu Thr Val
1 5 10 15

Gln Val Arg

<210> 237
<211> 24
<212> PRT
<213> artificial

20

<220>
<223> Secuencia de péptido

25

<400> 237

Gly Ala Arg Val Met Phe Leu Thr Val Gln Val Arg Gly Ser Arg Val
1 5 10 15

Met Phe Leu Thr Val Gln Val Arg
20

30

<210> 238
<211> 19
<212> PRT
<213> artificial

35

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 238

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Ala Arg Ala Phe Phe Leu His Met
1 5 10 15

40

Leu Met Arg

<210> 239
<211> 24
<212> PRT
<213> artificial

45

<220>

ES 2 679 995 T3

<223> Secuencia de péptido

<400> 239

Gly Ala Arg Ala Phe Phe Leu His Met Leu Met Arg Gly Ser Arg Ala
1 5 10 15

5 Phe Phe Leu His Met Leu Met Arg
20

<210> 240

<211> 20

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15 <400> 240

Arg Leu Ala Val Ala Leu Trp Phe Arg Pro Pro Arg Leu Ala Val Ala
1 5 10 15

Leu Trp Phe Arg
20

<210> 241

20 <211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia de péptido

<400> 241

Asp Leu Ala Val Ala Leu Trp Phe Asp Pro Pro Asp Leu Ala Val Ala
1 5 10 15

Leu Trp Phe Asp
20

30 <210> 242

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 242

40 Arg Ile Ala Ser Thr Val Tyr Val Arg Pro Pro Arg Ile Ala Ser Thr
1 5 10 15

Val Tyr Val Arg
20

<210> 243

<211> 20

45 <212> PRT

ES 2 679 995 T3

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

5

<400> 243

Asp Ile Ala Ser Thr Val Tyr Val Asp Pro Pro Asp Ile Ala Ser Thr
1 5 10 15

Val Tyr Val Asp
20

10

<210> 244

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 244

Arg Ile Leu Thr Ile Leu Ala Asn Arg Pro Pro Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10 15

Leu Ala Asn Arg
20

20

<210> 245

<211> 20

<212> PRT

25

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

30

<400> 245

Asp Ile Leu Thr Ile Leu Ala Asn Asp Pro Pro Asp Ile Leu Thr Ile
1 5 10 15

Leu Ala Asn Asp
20

35

<210> 246

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

40

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 246

Arg Val Ile Ile Leu Val Gly Thr Arg Pro Pro Arg Val Ile Ile Leu
1 5 10 15

Val Gly Thr Arg
20

45

ES 2 679 995 T3

<210> 247
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 247

10

Asp Val Ile Ile Leu Val Gly Thr Asp Pro Pro Asp Val Ile Ile Leu
1 5 10 15

Val Gly Thr Asp
20

<210> 248
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>
<223> Secuencia de péptido

20

<400> 248

Arg Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Arg Pro Pro Arg Met Ile Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Gly Met Arg
20

25

<210> 249
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

30

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 249

Asp Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Asp Pro Pro Asp Met Ile Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Gly Met Asp
20

35

<210> 250
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

40

<220>
<223> Secuencia de péptido

45

<400> 250

ES 2 679 995 T3

Arg Leu Met Val Ile Val Glu Phe Arg Pro Pro Arg Leu Met Val Ile
 1 5 10 15

Val Glu Phe Arg
 20

5 <210> 251
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 251

Asp Leu Met Val Ile Val Glu Phe Asp Pro Pro Asp Leu Met Val Ile
 1 5 10 15

Val Glu Phe Asp
 20

15 <210> 252
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 252

Arg Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Arg Pro Pro Arg Thr Val Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Val Ile Arg
 20

25 <210> 253
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 253

Asp Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Asp Pro Pro Asp Thr Val Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Val Ile Asp
 20

40 <210> 254
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 254

Arg Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Arg Pro Pro Arg Leu Ile Cys Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Gln Arg
20

5

<210> 255
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 255

15

Asp Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Asp Pro Pro Asp Leu Ile Cys Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Gln Asp
20

<210> 256
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

20

<220>
<223> Secuencia de péptido

25

<400> 256

Arg Val Ile Ser Phe His Val Ile Arg Pro Pro Arg Val Ile Ser Phe
1 5 10 15

His Val Ile Arg
20

30

<210> 257
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

35

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 257

Asp Val Ile Ser Phe His Val Ile Asp Pro Pro Asp Val Ile Ser Phe
1 5 10 15

His Val Ile Asp
20

40

<210> 258
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

45

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

5 <400> 258

Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Val Met Arg Pro Pro Arg Gly Tyr Leu Ser
1 5 10 15

Ile Val Met Arg
20

10 <210> 259

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 259

Asp Gly Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Pro Asp Gly Tyr Leu Ser
1 5 10 15

Ile Val Met Asp
20

20 <210> 260

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

25 <220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 260

30 <210> 260

Arg Leu Ala Val Ala Leu Trp Phe Arg Pro Pro Arg Ile Ala Ser Thr
1 5 10 15

Val Tyr Val Arg
20

35 <210> 261

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

40 <220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 261

Asp Leu Ala Val Ala Leu Trp Phe Asp Pro Pro Asp Ile Ala Ser Thr
1 5 10 15

Val Tyr Val Asp
20

45 <210> 262

ES 2 679 995 T3

<211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 262

Arg Ile Ala Ser Thr Val Tyr Val Arg Pro Pro Arg Ile Leu Thr Ile
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Arg
 20

10

<210> 263
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de péptido

20

<400> 263

Asp Ile Ala Ser Thr Val Tyr Val Asp Pro Pro Asp Ile Leu Thr Ile
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Asp
 20

25

<210> 264
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 264

Arg Ile Leu Thr Ile Leu Ala Asn Arg Pro Pro Arg Val Ile Ile Leu
 1 5 10 15

Val Gly Thr Arg
 20

35

<210> 265
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de péptido

45

<400> 265

ES 2 679 995 T3

Asp Ile Leu Thr Ile Leu Ala Asn Asp Pro Pro Asp Val Ile Ile Leu
 1 5 10 15

Val Gly Thr Asp
 20

5 <210> 266
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 266

Arg Val Ile Ile Leu Val Gly Thr Arg Pro Pro Arg Met Ile Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala Gly Met Arg
 20

15 <210> 267
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 267

Asp Val Ile Ile Leu Val Gly Thr Asp Pro Pro Asp Met Ile Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala Gly Met Asp
 20

25 <210> 268
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 268

Arg Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Arg Pro Pro Arg Leu Met Val Ile
 1 5 10 15

Val Glu Phe Arg
 20

40 <210> 269
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 269

Asp Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Asp Pro Pro Asp Leu Met Val Ile
 1 5 10 15

Val Glu Phe Asp
 20

5

<210> 270
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 270

15

Arg Leu Met Val Ile Val Glu Phe Arg Pro Pro Arg Thr Val Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Val Ile Arg
 20

20

<210> 271
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

25

<400> 271

Asp Leu Met Val Ile Val Glu Phe Asp Pro Pro Asp Thr Val Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Val Ile Asp
 20

30

<210> 272
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 272

40

Arg Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Arg Pro Pro Arg Leu Ile Cys Tyr
 1 5 10 15

Ser Phe Gln Arg
 20

45

<210> 273
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 273

5

Asp Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Asp Pro Pro Asp Leu Ile Cys Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Gln Asp
20

<210> 274

<211> 20

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15

<400> 274

Arg Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Arg Pro Pro Arg Val Ile Ser Phe
1 5 10 15

His Val Ile Arg
20

20

<210> 275

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 275

Asp Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Asp Pro Pro Asp Val Ile Ser Phe
1 5 10 15

His Val Ile Asp
20

30

<210> 276

<211> 20

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

40

<400> 276

Arg Val Ile Ser Phe His Val Ile Arg Pro Pro Arg Gly Tyr Leu Ser
1 5 10 15

Ile Val Met Arg
20

45

<210> 277

<211> 20

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 277

Asp Val Ile Ser Phe His Val Ile Asp Pro Pro Asp Gly Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Val Met Asp
 20

10 <210> 278
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 278

20 Leu Ala Val Ala Leu Trp Phe
 1 5

<210> 279
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de péptido

30 <400> 279

Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met
 1 5

35 <210> 280
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 280

Arg Ser Leu Thr Ser Thr Val Gln Arg Pro Pro Arg Ser Leu Thr Ser
 1 5 10 15

Thr Val Gln Arg
 20

45 <210> 281
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 281

Asp Ser Leu Thr Ser Thr Val Gln Asp Pro Pro Asp Ser Leu Thr Ser
1 5 10 15

Thr Val Gln Asp
20

5

<210> 282
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> Secuencia de péptido

15

<400> 282

Arg Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Arg Pro Pro Arg Val Trp Ser Tyr
1 5 10 15

Gly Val Thr Arg
20

20

<210> 283
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

25

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 283

Arg Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Arg Pro Pro Arg Ile Thr Gly Tyr
1 5 10 15

Leu Tyr Ile Arg
20

30

<210> 284
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

35

<220>
<223> Secuencia de péptido

<400> 284

Arg Leu Leu Gly Ile Ser Leu Thr Arg Pro Pro Arg Leu Leu Gly Ile
1 5 10 15

Ser Leu Thr Arg
20

40

<210> 285
<211> 20

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
 <213> artificial

<220>
 5 <223> Secuencia de péptido

<400> 285

Arg Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Arg Pro Pro Arg Ser Thr Val Gln
 1 5 10 15

Leu Val Thr Arg
 20

10 <210> 286
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 286

20 Asp Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Asp Pro Pro Asp Ser Thr Val Gln
 1 5 10 15

Leu Val Thr Asp
 20

<210> 287
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

30 <400> 287

Arg Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Arg Pro Pro Arg Leu Gly Val Val
 1 5 10 15

Phe Gly Ile Arg
 20

35 <210> 288
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 288

Asp Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Asp Pro Pro Asp Leu Gly Val Val
 1 5 10 15

Phe Gly Ile Asp
 20

45

ES 2 679 995 T3

5 <210> 289
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

10 <400> 289

Arg Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Arg Pro Pro Arg Ser Tyr Gly Val

1 5 10 15

Thr Val Trp Arg
 20

15 <210> 290
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 290

Asp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Asp Pro Pro Asp Ser Tyr Gly Val
 1 5 10 15

Thr Val Trp Asp
 20

25 <210> 291
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido

35 <400> 291

Arg Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Arg Pro Pro Arg Ser Ala Val Val
 1 5 10 15

Gly Ile Leu Arg
 20

40 <210> 292
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 292

ES 2 679 995 T3

Asp Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Asp Pro Pro Asp Ser Ala Val Val
 1 5 10 15

Gly Ile Leu Asp
 20

5 <210> 293
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 293

Arg Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Arg Pro Pro Arg Gly Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Arg
 20

15 <210> 294
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 294

Asp Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Asp Pro Pro Asp Gly Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Asp
 20

25 <210> 295
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 35 <400> 295

Asp Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Asp Thr Gly Tyr Leu
 1 5 10 15

Tyr Ile Ser Asp
 20

40 <210> 296
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

ES 2 679 995 T3

<400> 296

Asp Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Asp Pro Pro Asp Ile Ile Ser Ala

1 5 10 15

Val Val Gly Asp
20

5

<210> 297
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> Secuencia de péptido

15

<400> 297

Arg Val Tyr Met Ile Met Val Arg Pro Pro Arg Val Tyr Met Ile Met
1 5 10 15

Val Arg

20

<210> 298
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

25

<220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 298

Asp Val Tyr Met Ile Met Val Asp Pro Pro Asp Val Tyr Met Ile Met
1 5 10 15

Val Asp

30

<210> 299
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

35

<220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 299

Arg Val Val Gly Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Arg Val Val Gly Ile
1 5 10 15

Leu Leu Val Arg
20

40

<210> 300
<211> 20

ES 2 679 995 T3

<212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia de péptido

 <400> 300

 Asp Val Val Gly Ile Leu Leu Val Asp Pro Pro Asp Val Val Gly Ile
 1 5 10 15

 Leu Leu Val Asp
 20
 10
 <210> 301
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 301
 20
 Arg Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Arg Pro Pro Arg Ala Val Val Gly
 1 5 10 15

 Ile Leu Leu Arg
 20

 <210> 302
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 30
 <400> 302

 Asp Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Asp Pro Pro Asp Ala Val Val Gly
 1 5 10 15

 Ile Leu Leu Asp
 20

 35 <210> 303
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 <400> 303

ES 2 679 995 T3

Arg Val Leu Gly Val Val Phe Gly Arg Pro Pro Arg Val Leu Gly Val

1 5 10 15

Val Phe Gly Arg
20

5 <210> 304
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 304

Asp Val Leu Gly Val Val Phe Gly Asp Pro Pro Asp Val Leu Gly Val
1 5 10 15

Val Phe Gly Asp
20

15 <210> 305
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 305

Arg Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Arg Pro Pro Arg Val Val Phe Gly
1 5 10 15

Ile Leu Ile Arg
20

25 <210> 306
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido
35 <400> 306

Asp Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Asp Pro Pro Asp Val Val Phe Gly
1 5 10 15

Ile Leu Ile Asp
20

40 <210> 307
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 679 995 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 307

5

Arg Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Arg Pro Pro Arg Gly Val Val Phe
1 5 10 15

Gly Ile Leu Arg
20

<210> 308

<211> 20

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15

<400> 308

Asp Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Asp Pro Pro Asp Gly Val Val Phe
1 5 10 15

Gly Ile Leu Asp
20

20

<210> 309

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 309

Ile His Ile Phe Val Leu Ser
1 5

30

<210> 310

<211> 7

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

40

<400> 310

His Ile Phe Val Leu Ser Asn
1 5

45

<210> 311

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 311

ES 2 679 995 T3

Ile Phe Val Leu Ser Asn Ile
1 5

5 <210> 312
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 312

Phe Val Leu Ser Asn Ile Leu
1 5

15 <210> 313
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 313

Ile Ile Val Ile Ser
1 5

25 <210> 314
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 314

Tyr Leu Met Val Ile
1 5

40 <210> 315
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 315

Phe Ser Thr Leu Ser Phe Ile
1 5

50 <210> 316
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

55 <220>
<223> Secuencia de péptido
<400> 316

60

ES 2 679 995 T3

Ile His Ile Phe Val Leu Ser Asn Ile Leu
 1 5 10

5 <210> 317
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 317

Arg Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Asp Pro Pro Arg
 1 5 10 15

Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Asp
 20 25

15 <210> 318
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 318

Arg Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Arg Pro Pro Arg
 1 5 10 15

Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Arg
 20 25

30 <210> 319
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de péptido

35 <400> 319

Arg Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Pro Pro Pro Arg
 1 5 10 15

Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Pro
 20 25

40 <210> 320
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de péptido

<400> 320

ES 2 679 995 T3

Arg Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe His Pro Pro Arg
 1 5 10 15

Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe His
 20 25

5 <210> 321
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 321

Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu
 1 5

15 <210> 322
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 322

Glu Asn Ala Val Asp
 1 5

25 <210> 323
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 323

Gly Thr Pro Thr Arg Glu Glu
 1 5

35 <210> 324
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido
 <400> 324

Ala Gly Ser Pro Lys Gly Ala Pro Ala Ala Lys Gly Ser Gly Ala
 1 5 10 15

45 <210> 325
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>

ES 2 679 995 T3

<223> Secuencia de péptido

<400> 325

5 Arg Val Val Gly Thr Gly Ser Phe Gly Ile Val Phe Lys
1 5 10

<210> 326

<211> 11

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

15 <400> 326

Arg Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu Arg
1 5 10

<210> 327

20 <211> 28

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia de péptido

<400> 327

Gln Trp Gln Asn Ser Thr Leu Ile Val Leu Gln Asn Ser Thr Val Ile
1 5 10 15

Phe Glu Gln Asn Ser Thr Val Ile Phe Glu Gln Asn
20 25

30

<210> 328

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> Secuencia de péptido

<400> 328

40

Glu Asn Ala Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu Gly Thr
1 5 10 15

Pro Thr Arg Glu Glu
20

<210> 329

45

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido

50

<400> 329

Met Ala Asp Asp Lys Glu
1 5

<210> 330
 <211> 42
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptido

 10 <400> 330

 Glu Asn Ala Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu Gly Thr
 1 5 10 15

 Pro Thr Arg Glu Glu Glu Asn Ala Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile
 20 25 30

 Lys Val Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Glu
 35 40

 15 <210> 331
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 331

 25 gtgatctcag ccgtacattt gga 23

 <210> 332
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 30

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 332

 cacgtcgaaa aactaccact tcct 24

 40 <210> 333
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador
 45

 <400> 333

 gaatggagtg attacaagtc 20

 50 <210> 334
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

 55 <220>
 <223> Cebador

<400> 334
 5 gtgaacacat tagaagggcc tg 22
 <210> 335
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 335
 15 ctcatTTGCC aatcctgtat c 21
 <210> 336
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 336
 gcactgagat gcgacatctt g 21
 30 <210> 337
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 337
 40 tgactcttat ccgcttgaac ag 22
 <210> 338
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 338
 tcctacgttg ctttactga c 21
 <210> 339
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 339
 gtggttcctt cactgtcact ag 22
 65 <210> 340

ES 2 679 995 T3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 340
 10 ttcaccaagt cttgagtct cc 22
 <210> 341
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 341
 tgaaggaag aggatgcagc 20
 <210> 342
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 342
 tgtatttcat cgtgagagc tg 22
 35 <210> 343
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 343
 45 gctatttca gcggtgaagg 20
 <210> 344
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 55 <400> 344
 ttctcgtctt ggatggtgtt c 21
 60 <210> 345
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> Cebador

ES 2 679 995 T3

<400> 345
 5 gaaacagaac cactccctcg 20
 <210> 346
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 346
 15 ccaatcaacc tcttgcatc g 21
 <210> 347
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 347
 aacagaacca caccgtctta c 21
 30 <210> 348
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 348
 40 accaatcaac ctctcgcat c 21
 <210> 349
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 349
 attgcgtatt gccactctca tagg 24
 <210> 350
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 350
 tctgacagg gataccgaat gc 22
 65 <210> 351

ES 2 679 995 T3

<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 351

10 ctggaggttt tgaggctggt at 22

<210> 352
<211> 21

15 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 352

ccaaggctga aagcaagaag a 21

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir la agregación de una proteína que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 5
- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 - 10 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran en dicha proteína; y
 - 15 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de inducir la agregación de dicha proteína;
y en donde el método no se practica en el cuerpo de un ser humano o un animal.

2. Un método para regular a la baja la función biológica de una proteína que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 25
- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en dicha proteína; y
 - 30 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula se capaz de regular a la baja la función biológica de dicha proteína;
y en donde el método no se practica en el cuerpo de un ser humano o un animal.

3. Una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 45
- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína; y
 - 50 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

55 en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica de dicha proteína en un sujeto es terapéuticamente útil;
para su uso como medicamento.

60 4. La molécula de la reivindicación 3, en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante de una enfermedad, para su uso en el tratamiento o prevención de dicha enfermedad.

65 5. La molécula de la reivindicación 3, en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil en el cáncer, como en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante del cáncer, para su uso en el

tratamiento del cáncer.

6. La molécula de la reivindicación 3, en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil en la AMD, como en
5 donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante de la AMD, para su uso en el tratamiento de la AMD.

7. La molécula de la reivindicación 3, en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica en un sujeto es terapéuticamente útil en una enfermedad
10 inflamatoria, como en donde la expresión o sobreexpresión de dicha proteína se asocia con o es causante de una enfermedad inflamatoria, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

8. Una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 15 - n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre: R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
20 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de
25 aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína de un organismo patógeno; y
- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la
30 función biológica de dicha proteína en el organismo patógeno elimina el organismo patógeno o inhibe el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno; para su uso como compuesto antipatógenos en el tratamiento de una enfermedad infecciosa causada por el organismo patógeno.

9. Un método para eliminar un organismo patógeno o inhibir el crecimiento y/o la reproducción de un organismo patógeno que comprende poner en contacto el organismo patógeno con una molécula de la siguiente estructura:
35 $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 40 - n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al
45 menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína del organismo patógeno; y
50 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la
función biológica de dicha proteína en el organismo patógeno elimina el organismo patógeno o inhibe el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno; y en donde el método no se practica en el cuerpo de un ser humano o
55 un animal.

10. La molécula para su uso de la reivindicación 8 o el método de la reivindicación 9, en donde el patógeno es un organismo vírico.

60 11. La molécula para su uso de la reivindicación 8 o el método de la reivindicación 9, en donde el patógeno es un organismo microbiano seleccionado de entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias, hongos, levaduras y mohos.

65 12. La molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8 o el método de la reivindicación 9, en donde la molécula se proporciona en un dispositivo implantable recubierto al menos parcialmente con la molécula.

13. Un dispositivo implantable recubierto al menos parcialmente con moléculas de la estructura $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 5 - n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 10 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos adicionales se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en una proteína de un organismo patógeno; y
- 15 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función de dicha proteína y en donde la unión de la molécula a dicha proteína, la agregación de dicha proteína o la regulación a la baja de la función biológica de dicha proteína en el organismo patógeno elimina el organismo patógeno o inhibe el crecimiento y/o la reproducción del organismo patógeno.

14. Un método para seleccionar nuevos compuestos inhibidores y/o de detección, que comprende las etapas de:

- 25 a) identificar en al menos una proteína al menos una región de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos adicionales se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E;

30 b) sintetizar una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 35 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína identificada en la etapa a); y
- 40 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

45 c) poner en contacto la molécula preparada en la etapa b) con la proteína de la etapa a); y

d) evaluar la función y/o la agregación de la proteína.

15. Un método para identificar nuevas dianas para compuestos inhibidores, que comprende el método de la reivindicación 14, en donde la proteína en la etapa a) no es una diana conocida para compuestos inhibidores.

50 16. Un método para detectar una proteína en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener la proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- 55 - n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;
- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;
- 60 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos adicionales se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína que se va a detectar; y
- 65 - cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función biológica de dicha proteína;

b) detectar la presencia de las moléculas que han reaccionado con la proteína.

5 17. El método de la reivindicación 16, en donde el al menos un Y_i que es idéntico a o difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de la serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína que se va a detectar es único para dicha proteína en dicha muestra.

10 18. El método de la reivindicación 16 o 17, en donde la molécula comprende un marcador detectable y la detección en la etapa b) es mediante la detección del marcador detectable.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la molécula se proporciona sobre un soporte sólido.

15 20. El método de la reivindicación 19, en donde al menos dos moléculas diferentes son capaces de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función biológica de dos proteínas diferentes que se van a detectar se proporcionan sobre el soporte sólido.

20 21. Un método *in vitro* para el diagnóstico del estado de una enfermedad que comprende detectar una proteína que es indicativa del estado de la enfermedad en una muestra de un sujeto, en donde la proteína se detecta mediante un método que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener la proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

25 - n es 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;

- cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se seleccionan independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, A, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;

30 - cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos adicionales se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en la proteína que se va a detectar; y

- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

40 en donde la molécula es capaz de unirse a, inducir la agregación de o regular a la baja la función biológica de la proteína que se va a detectar;

b) detectar la presencia de las moléculas que han reaccionado con la proteína.

45 22. Un método para regular a la baja la función biológica de una proteína en una planta, una célula vegetal o una semilla de planta, que comprende poner en contacto dicha proteína con una molécula de la siguiente estructura: $(X_{2i-1}-Y_i-X_{2i}-Z_i)_n$, en donde:

- n es un número entero de 1 a 5 e i aumenta de 1 a n con cada repetición;

50 - cada uno de X_{2i-1} y X_{2i} se selecciona independientemente de entre 1 a 4 aminoácidos contiguos seleccionados de entre : R, K, E, D, P, N, S, H, G y Q; más particularmente, 1 a 4 aminoácidos seleccionados de entre R, K, E, D y P;

- cada Y_i es una secuencia beta agregante seleccionada independientemente de entre una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos, siendo al menos un 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y en la que está presente al menos un resto alifático o F y en caso de que solo esté presente un resto alifático o F, al menos uno y preferentemente al menos dos, restos diferentes se seleccionan de entre Y, W, A, M y T; y en la que está presente no más de 1 y preferentemente ningún resto de P, R, K, D o E y en donde al menos un Y_i es una serie idéntica o que difiere en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie contigua de aminoácidos que se encuentran de manera natural en dicha proteína en dicha planta, célula vegetal o semilla de planta; y

- cada Z_i es un enlazador y Z_n se selecciona independientemente de entre un enlazador o nada;

60 en donde la molécula se capaz de regular a la baja la función biológica de dicha proteína.

65 23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la molécula es un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos presente en un vector recombinante y que, tras su introducción en la célula vegetal, la semilla de planta o la planta, produce dicho polipéptido en dicha célula vegetal, la semilla de planta o la planta.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20 o 21-23, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8 o 10-12 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13, en donde cada X_{2i-1} y X_{2i} tiene 1 o 2 aminoácidos.
- 5 25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-24, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24, en donde al menos una y más particularmente todas, Y_i es una serie de 6 a 13 aminoácidos, particularmente de 6 a 9 aminoácidos, más particularmente de 6 o 7 aminoácidos.
- 10 26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-25, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-25 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-25, en donde al menos dos y en particular cada, Y_i son cada uno independientemente idénticos a o difieren en no más de una sustitución de aminoácidos respecto de una serie de 6 a 16 aminoácidos contiguos que se encuentran de manera natural en una proteína.
- 15 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-26, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-26 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-26, en donde cada Z_i se selecciona independientemente de entre una serie de de entre 0 y 20 unidades, en donde una unidad es un aminoácido, un monosacárido, un nucleótido, ácido trioxadecan-succínico (Ttds) o PEG.
- 20 28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-26, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-26 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-26, en donde cada Z_i se selecciona independientemente de entre una serie de de entre 0 y 20 unidades, en donde una unidad es un aminoácido.
- 25 29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-26, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-26 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-26, en donde cada Z_i se selecciona independientemente de una serie de entre 0 y 10 unidades, en donde una unidad es un aminoácido o PEG.
- 30 30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-29, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-29 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-29, en donde n es 1, X_1 y X_2 son en total no más de 5 aminoácidos, Y_1 es una serie de entre 6 y 10 aminoácidos y Z_1 es una serie de 0 unidades.
- 35 31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-29, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-29 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-29, en donde n es 2, Z_1 es un enlazador y Z_2 es nada.
- 40 32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 9-12, 14-20, 21-31, la molécula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, 10-12 o 24-31 o el dispositivo implantable de la reivindicación 13 o 24-31, que además comprende un resto que aumenta la solubilidad de la molécula.

Figura 1

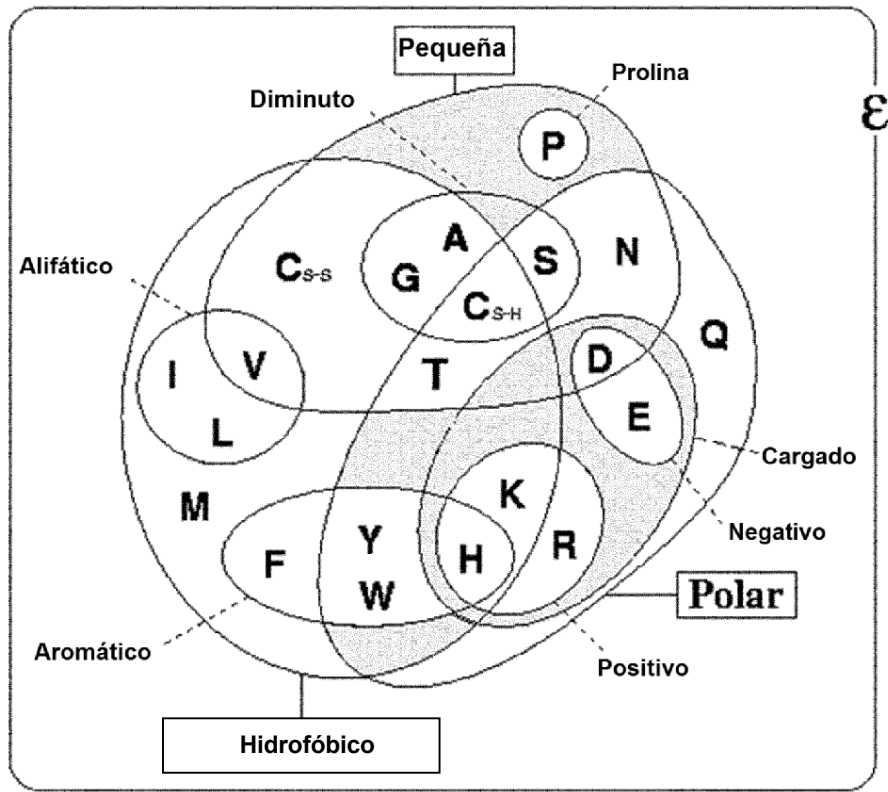


Figura 2

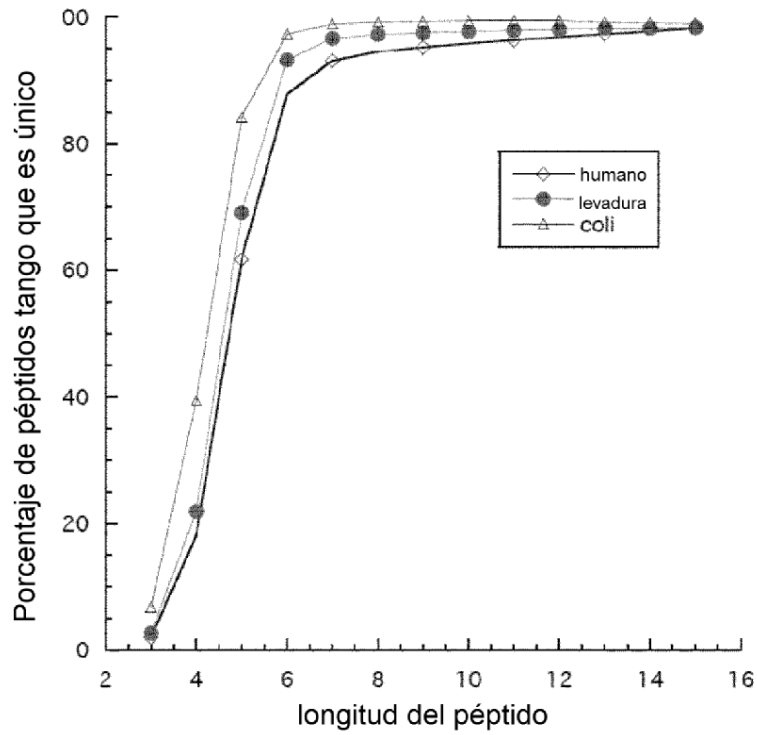


Figura 3

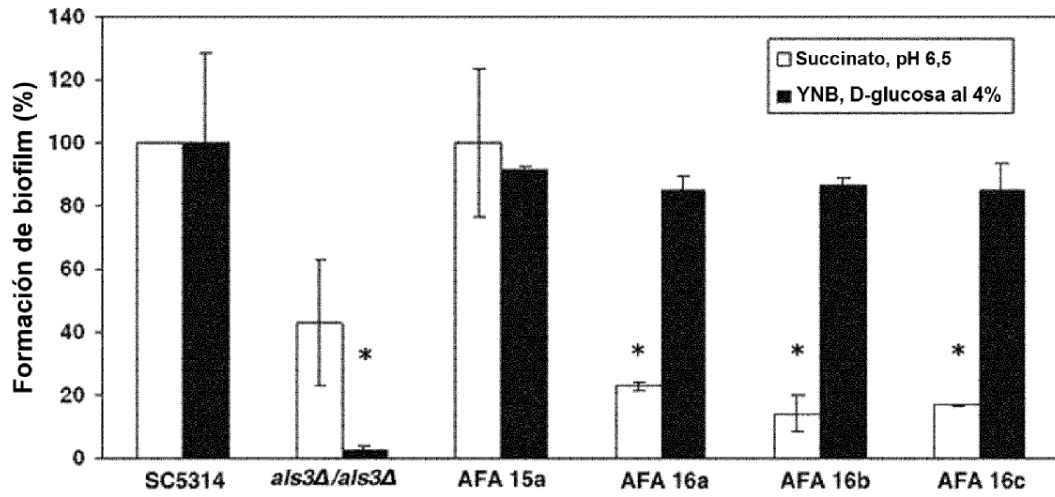
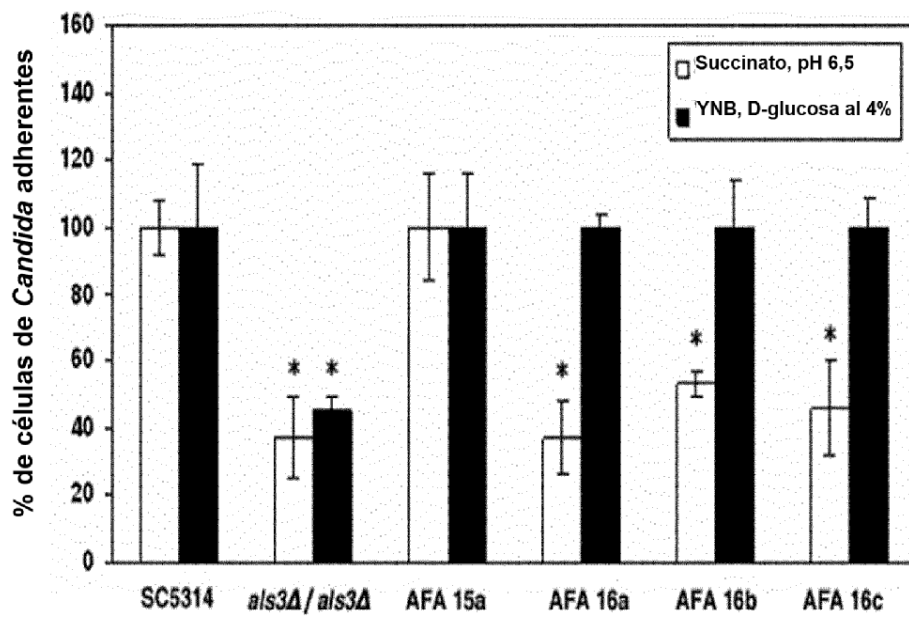


Figura 4

A



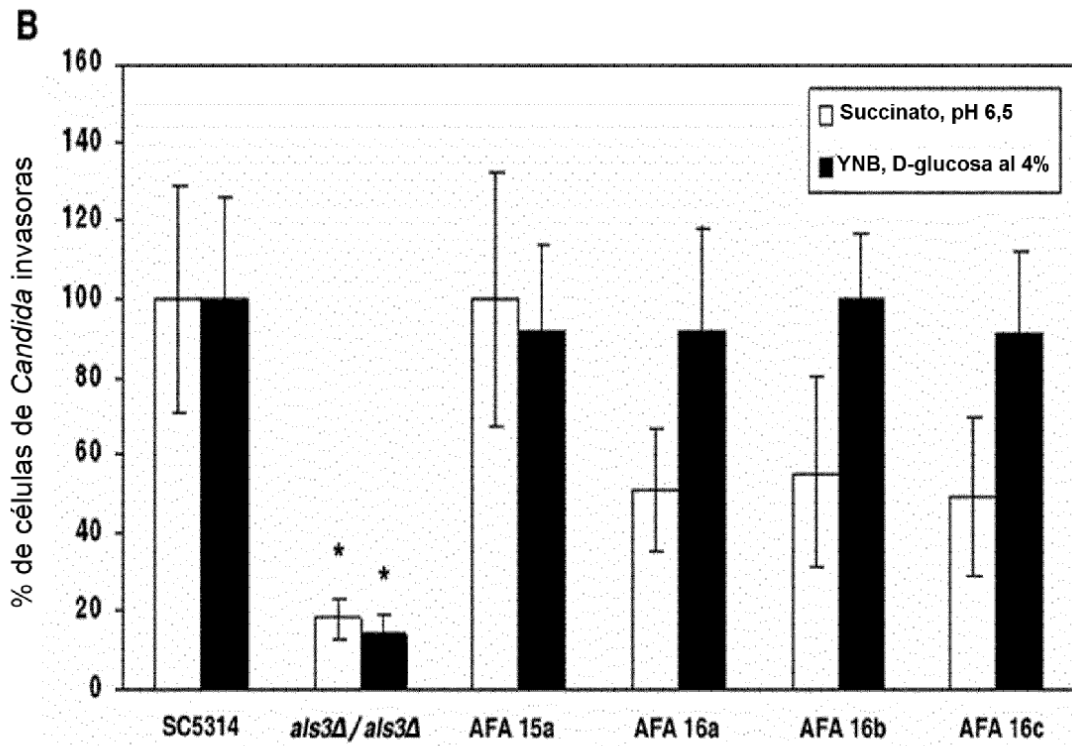
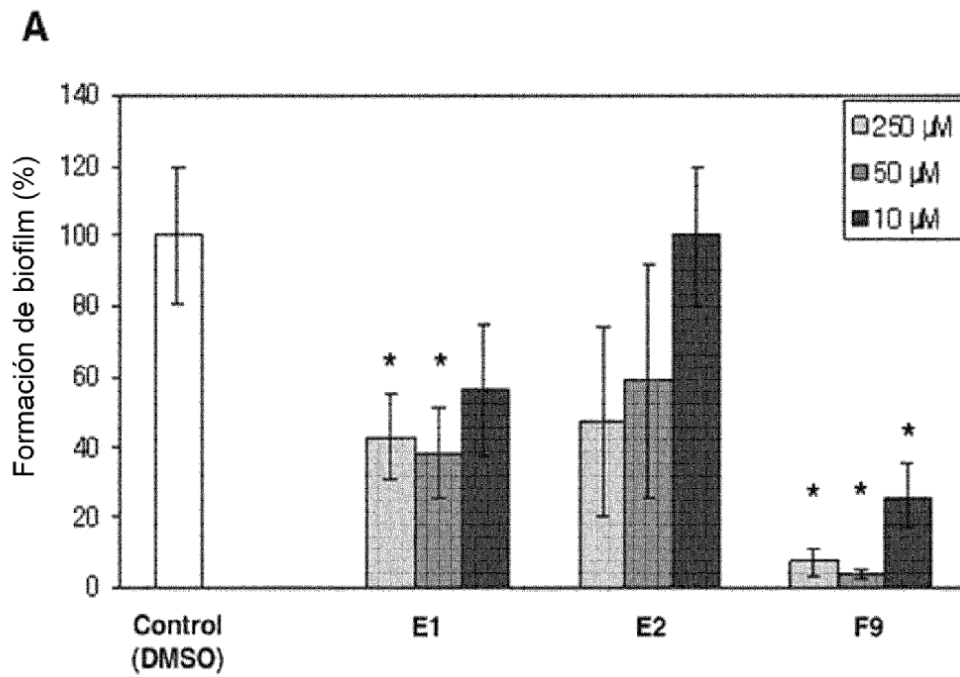


Figura 5



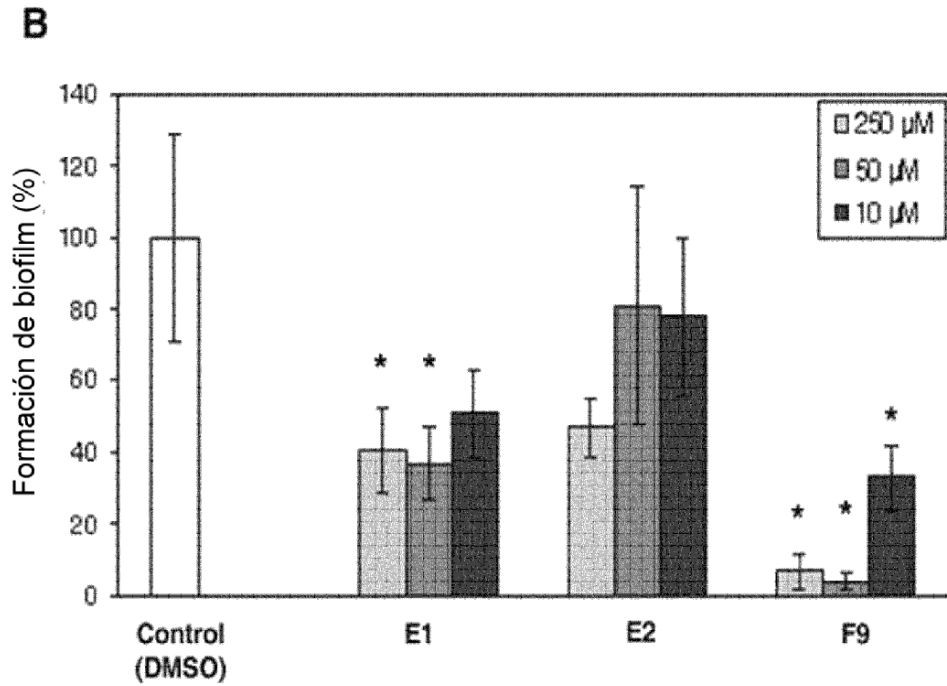
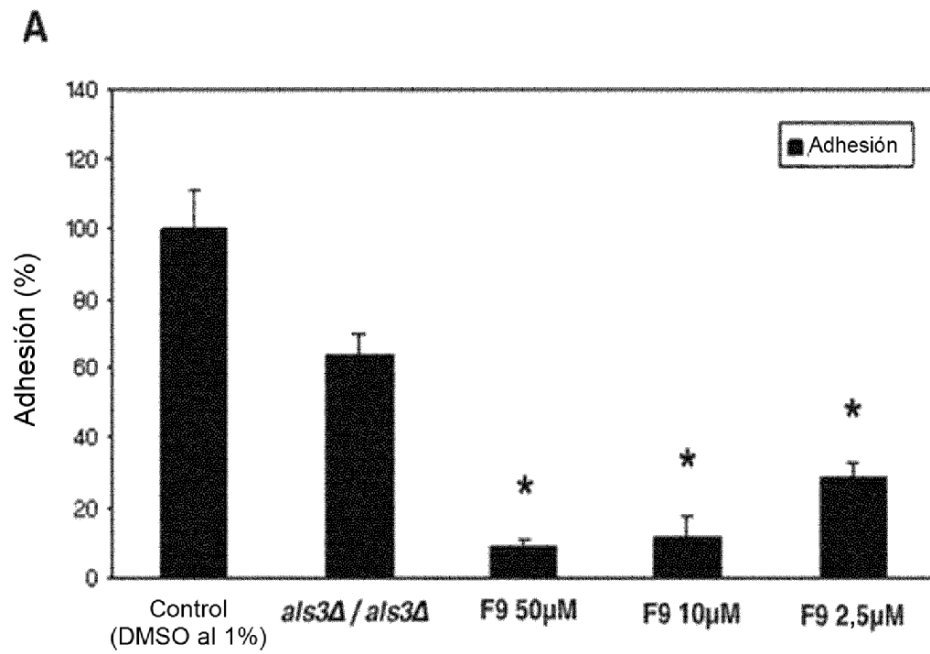


Figura 6



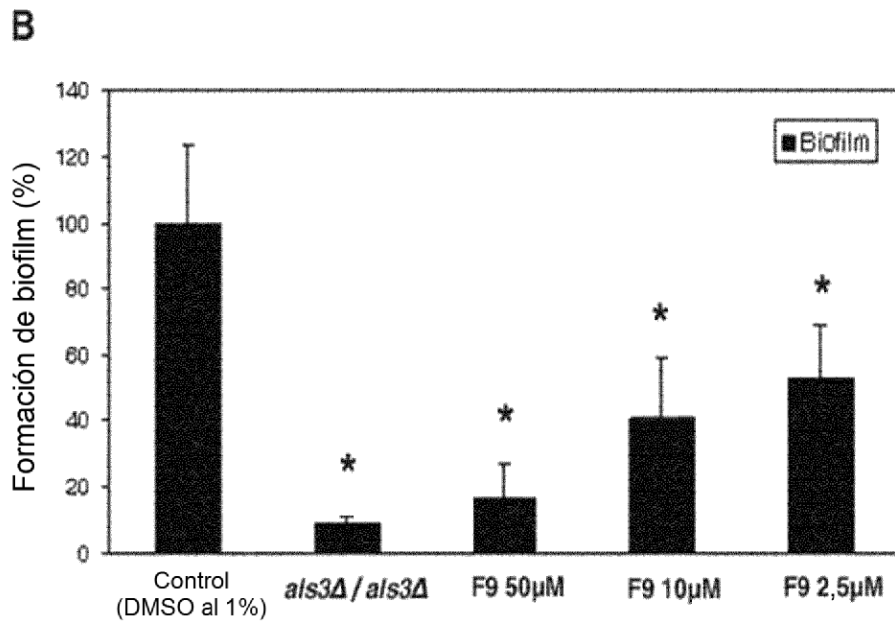


Figura 7

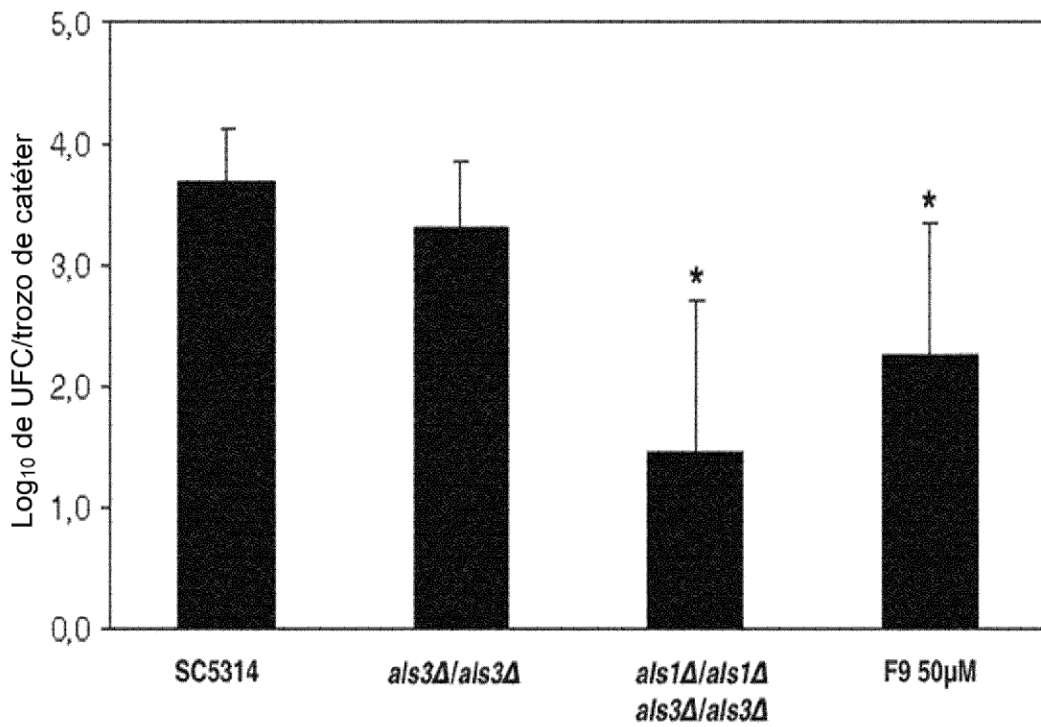


Figura 8

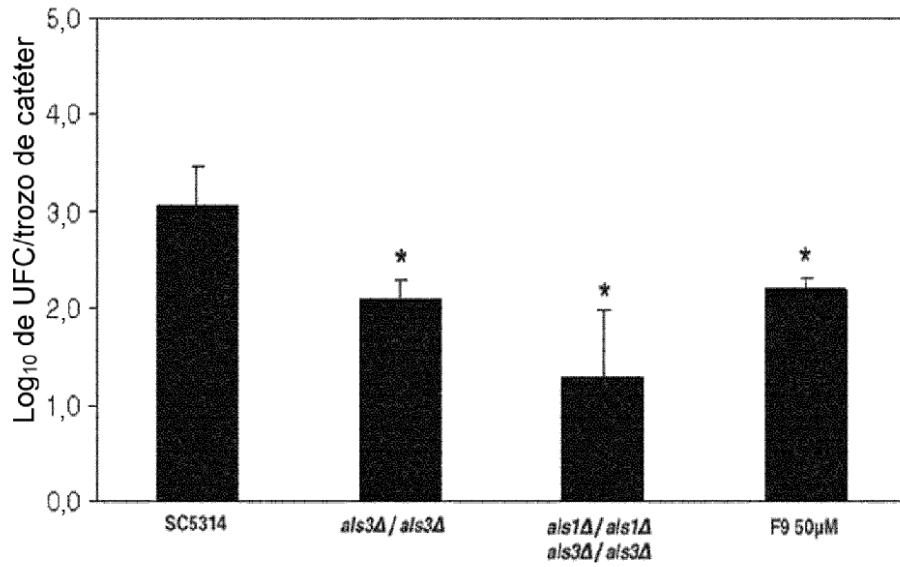


Figura 9

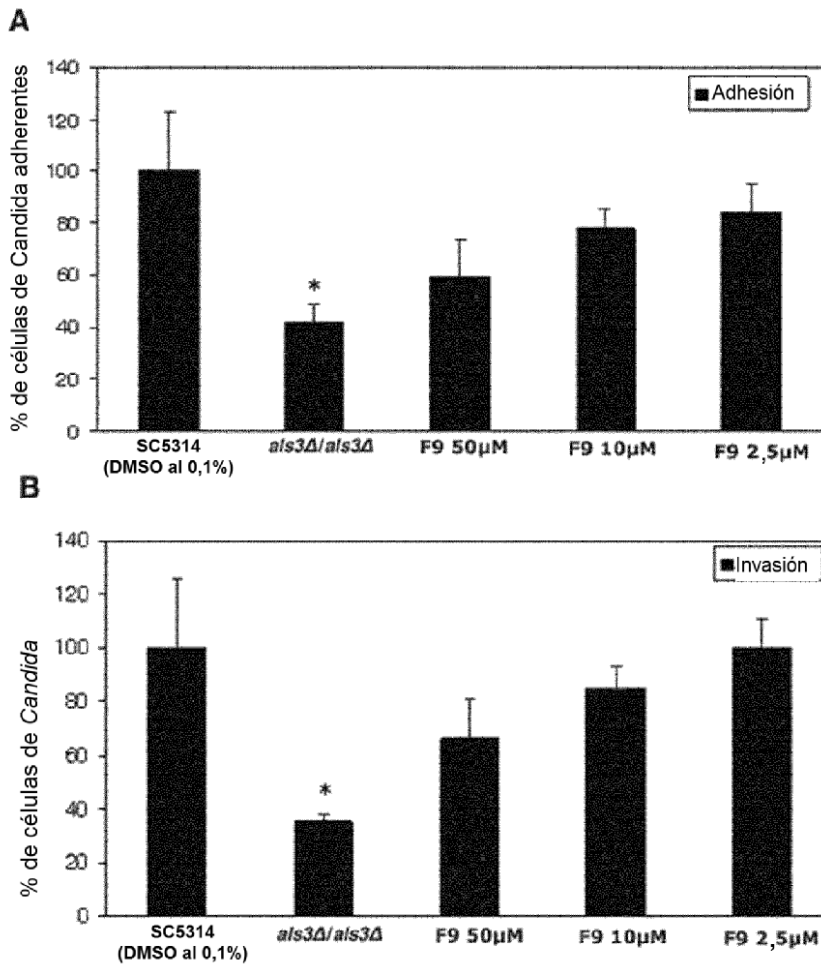


Figura 10

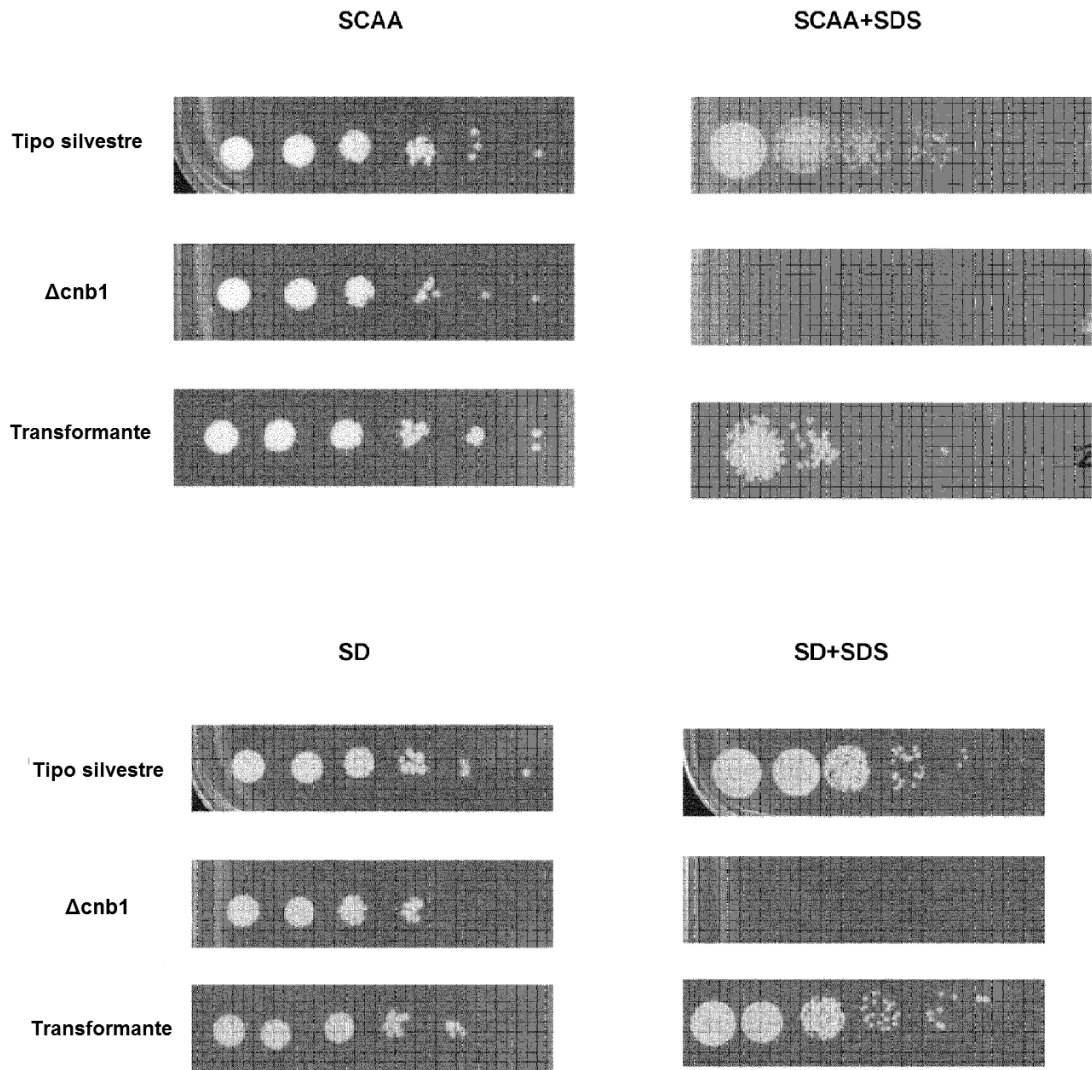


Figura 11

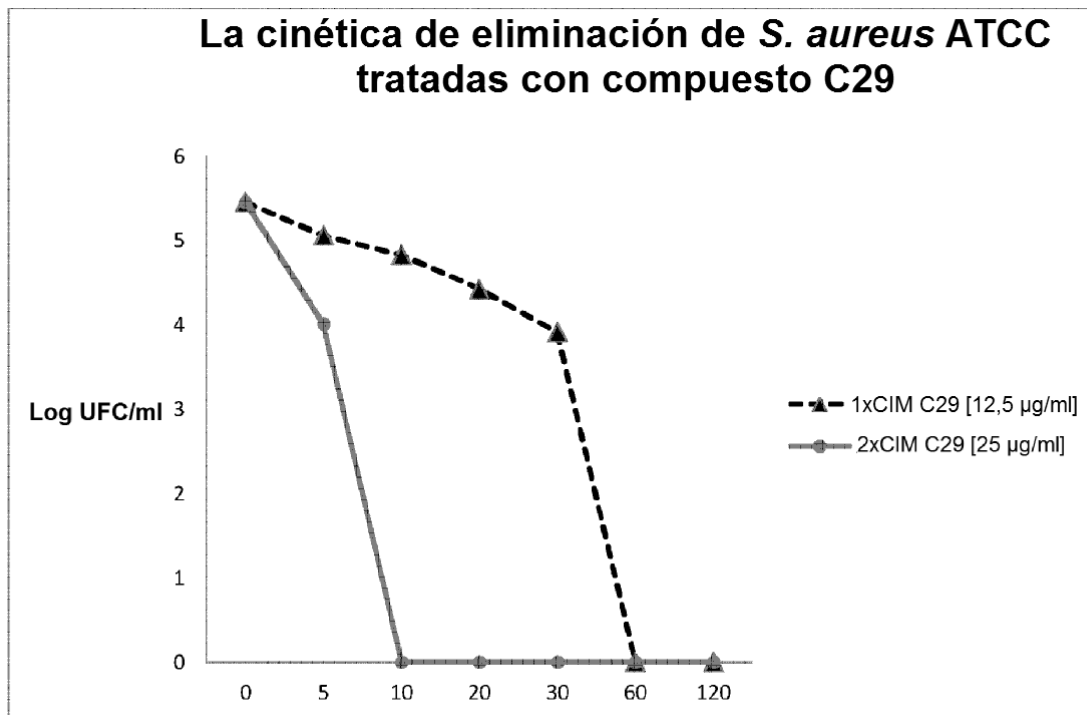
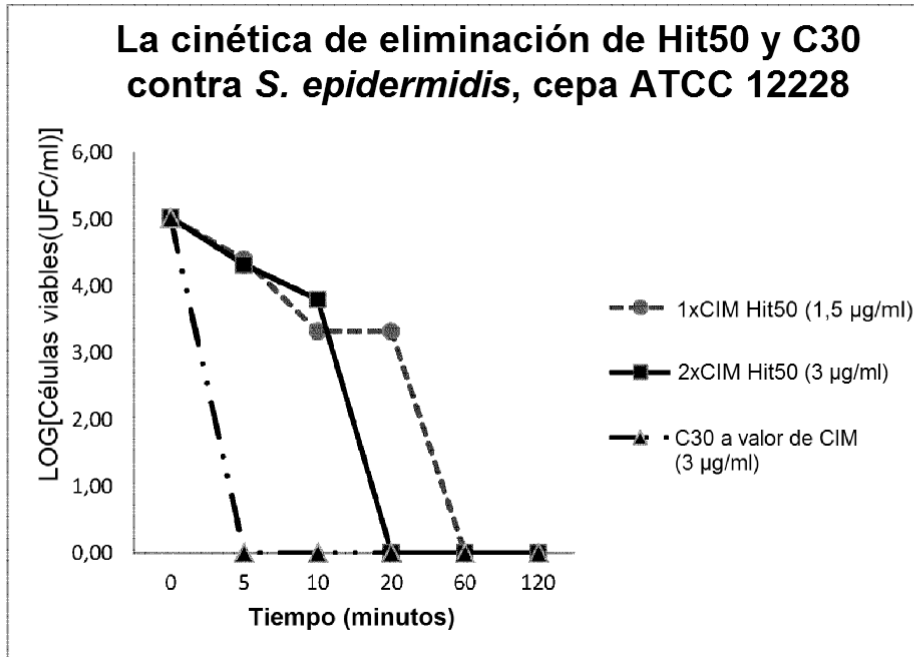


Figura 12

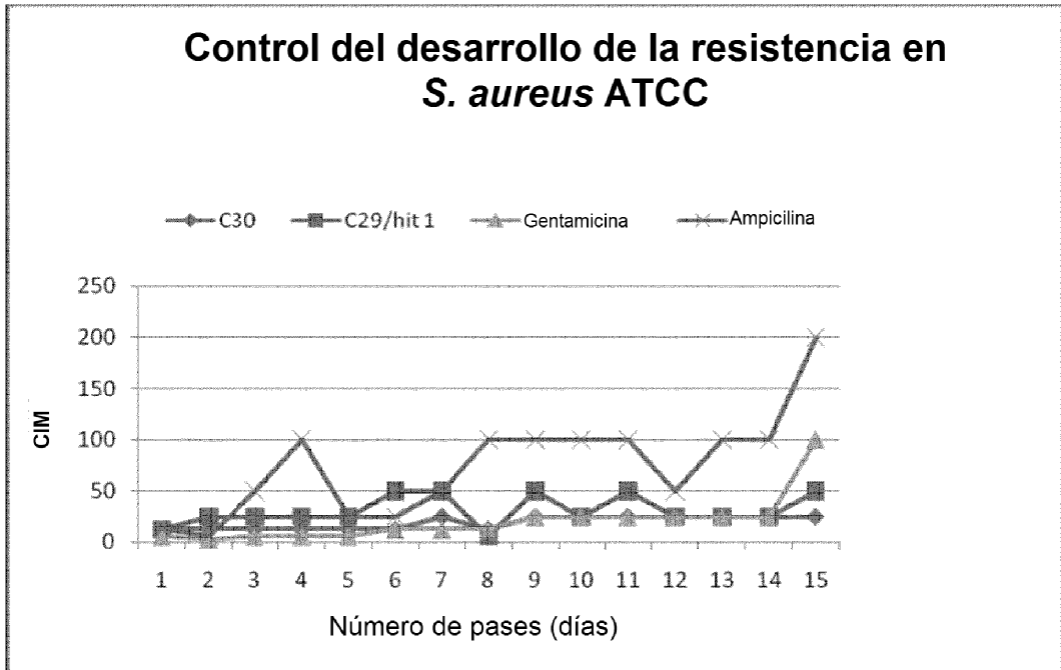


Figura 13

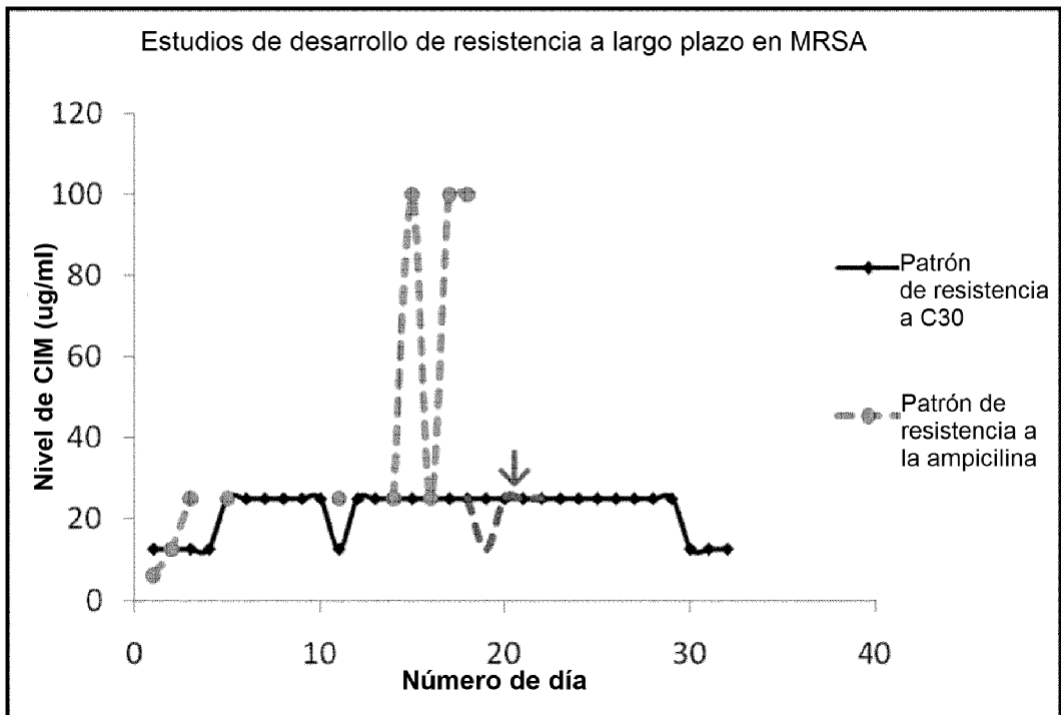


Figura 14

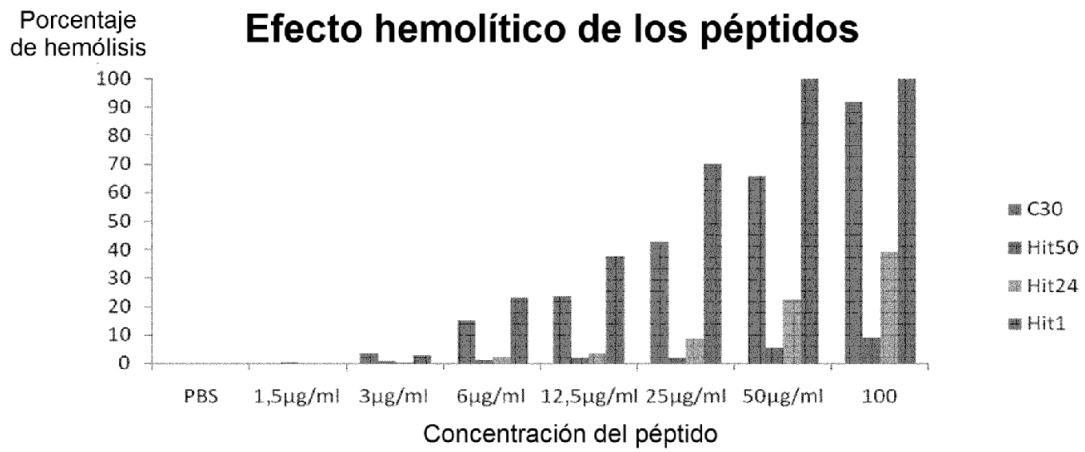
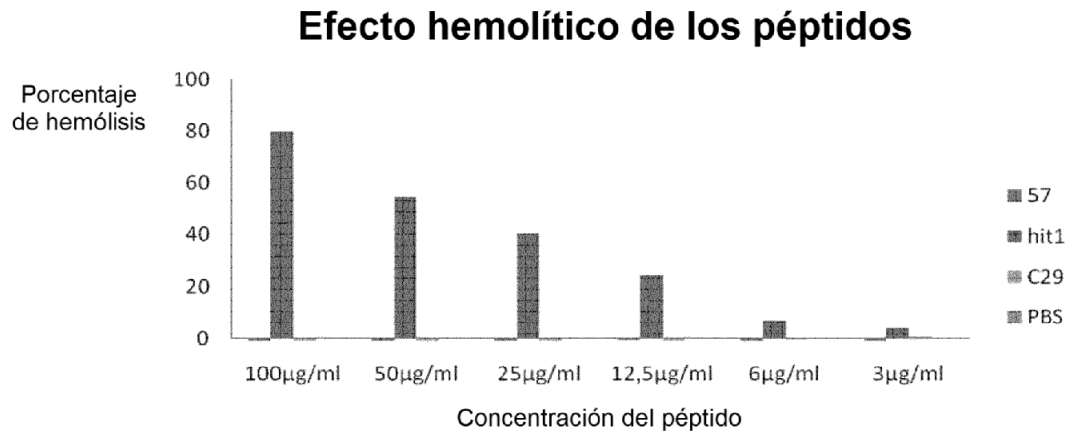


Figura 15

Control del desarrollo de resistencia en MRSA a sub-CIM de péptido C30

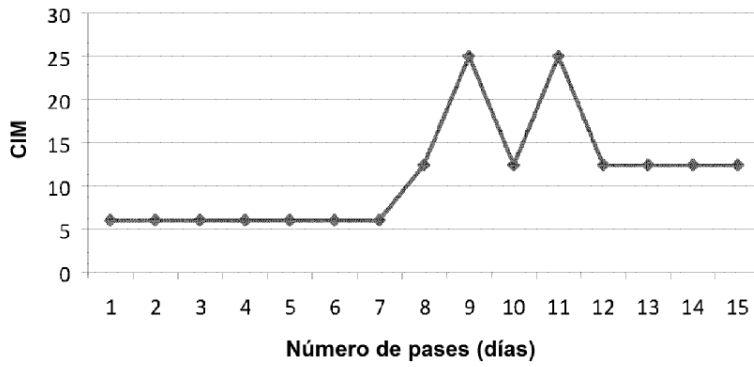


Figura 16

El efecto de los péptidos en la permeabilidad de membrana de células HEK293T

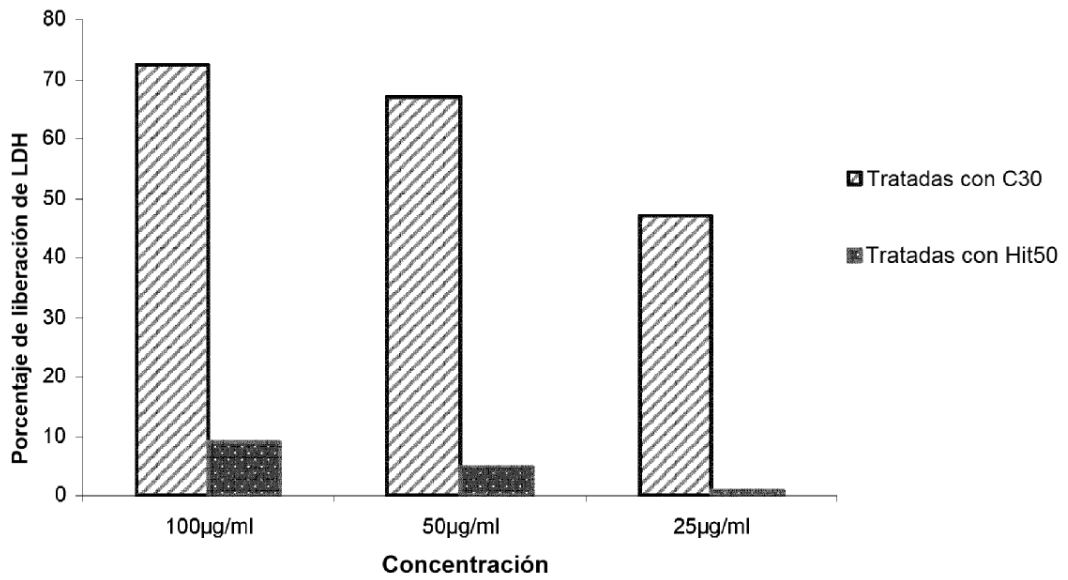


Figura 17

Ensayo de citotoxicidad de Alamar Blue para la línea celular HEK293T

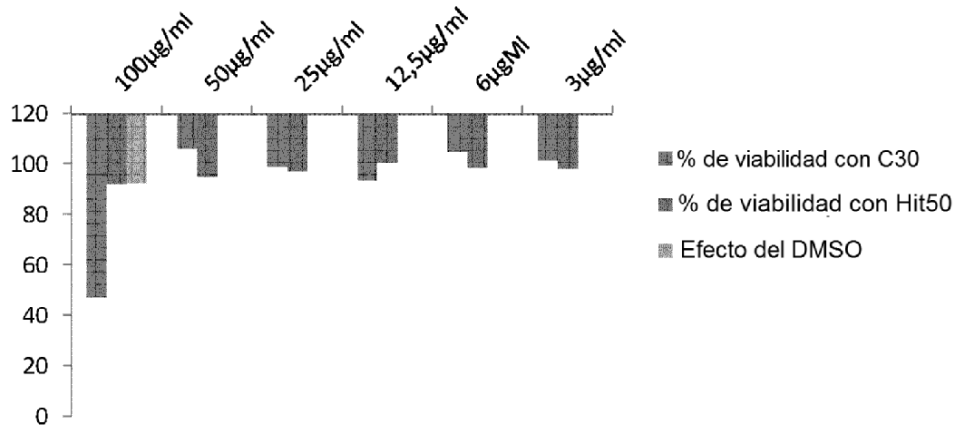


Figura 18

Control de la permeabilidad de membrana de *S. aureus* con el tiempo

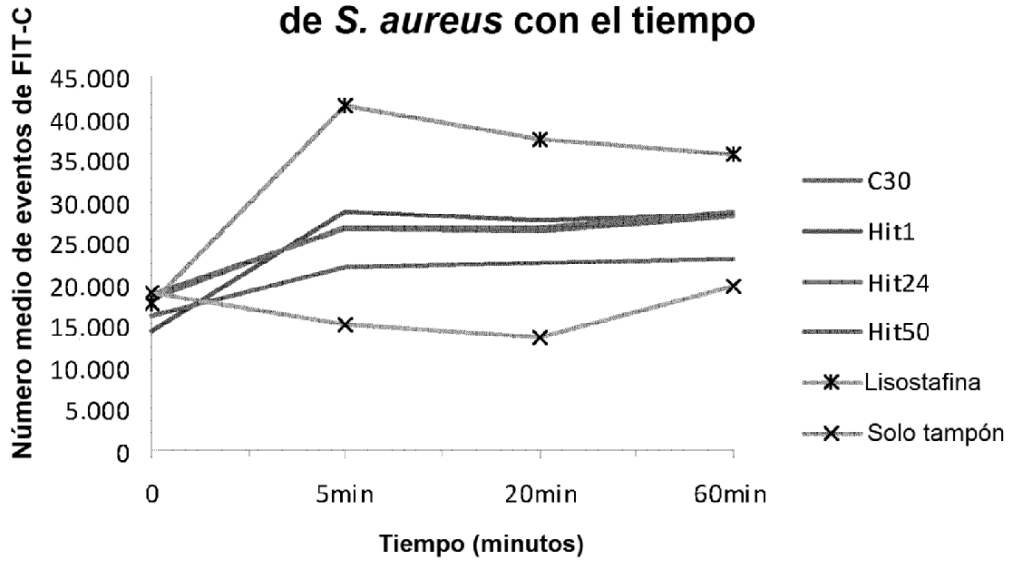


Figura 19

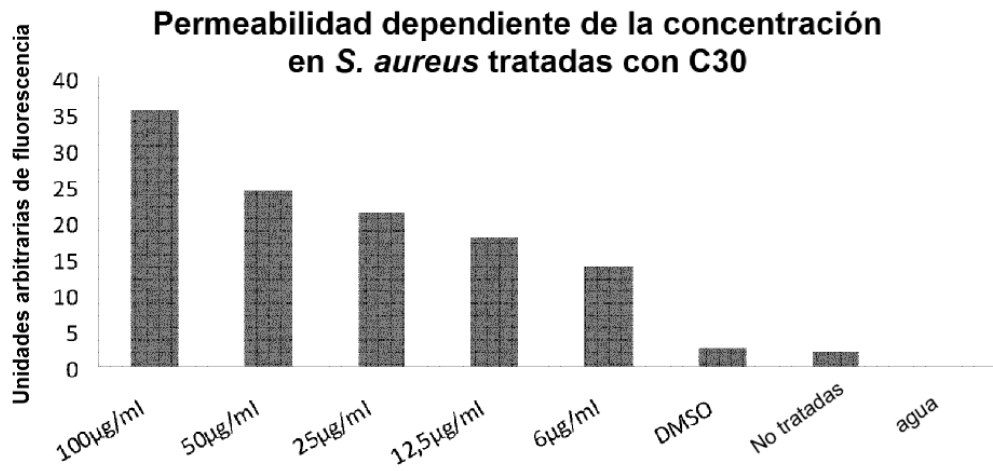
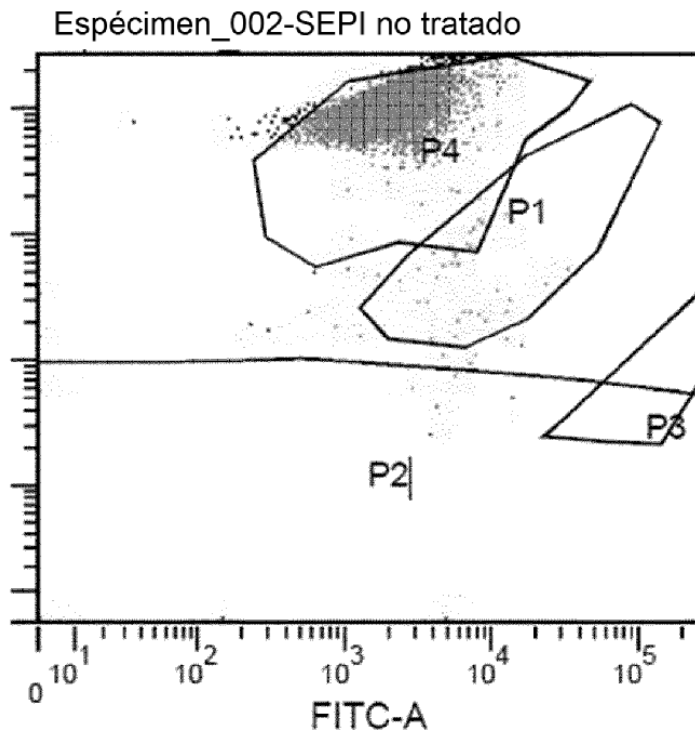


Figura 20

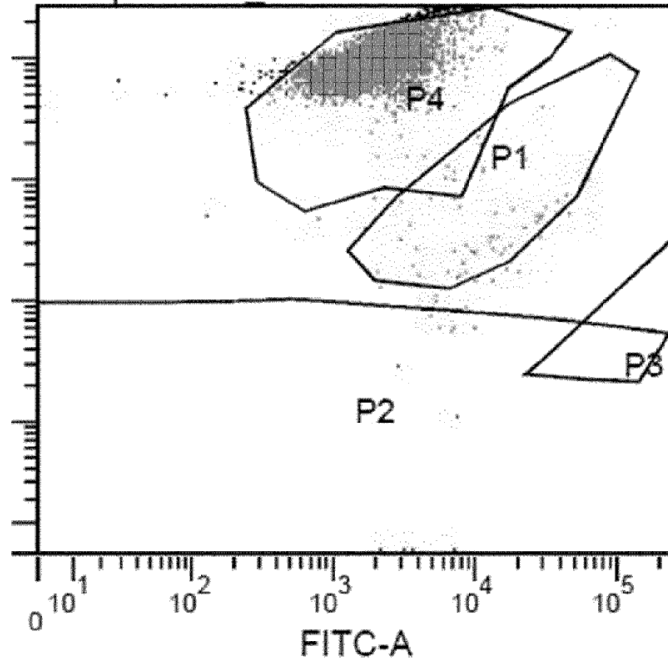
Cambio de potencial de membrana con el tiempo para C30 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228)

A



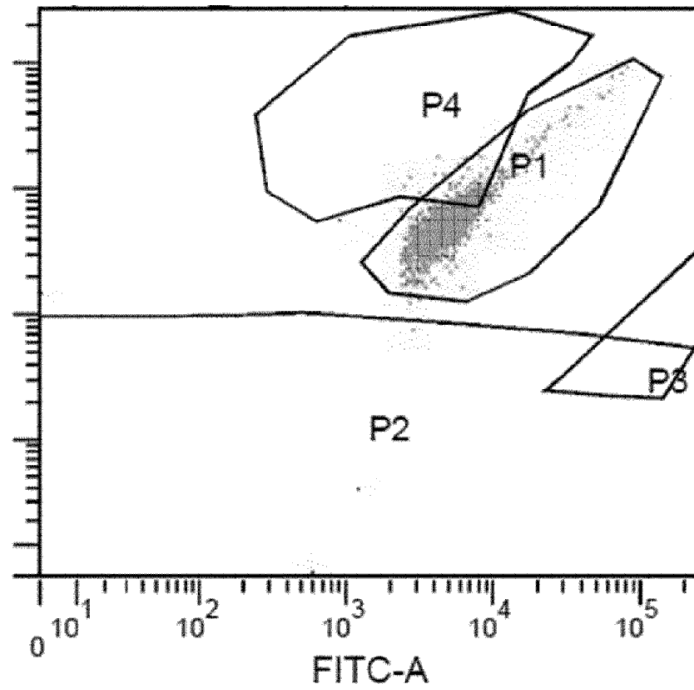
B

Espécimen_002-DMSO SEPI



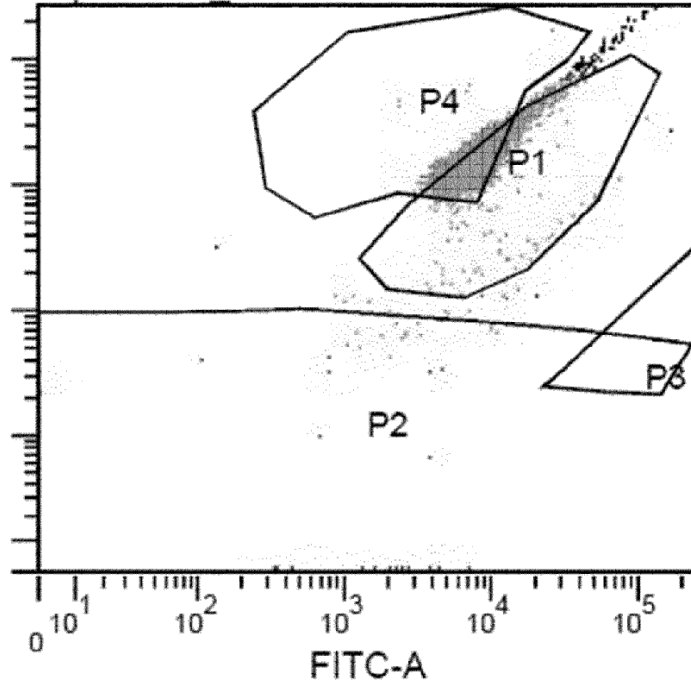
C

Espécimen_002-SEPI control de despolarización



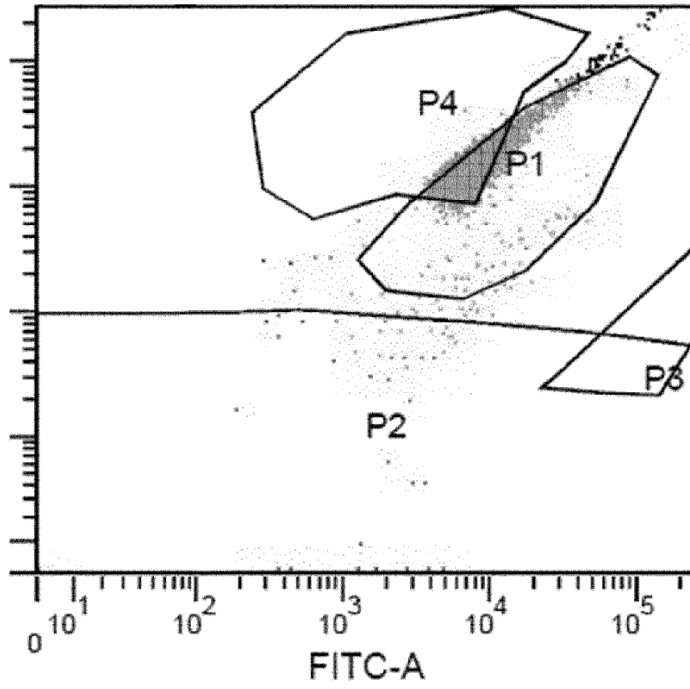
D

Espécimen_002-C30 3 SEPI tiempo 0



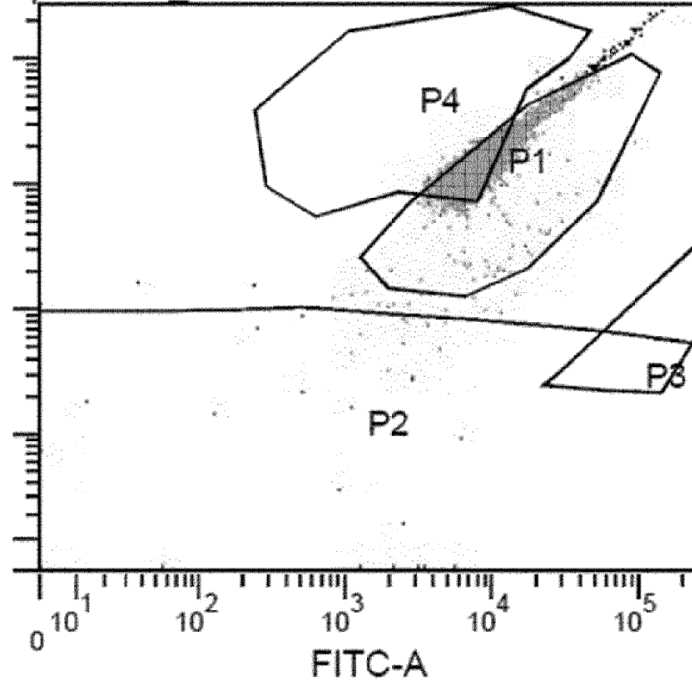
E

Espécimen_002-C30 3 SEPI tiempo 5 min



F

Espécimen_002-C30 3 SEPI tiempo 15 min



G

Espécimen_002-LYSE SEPI

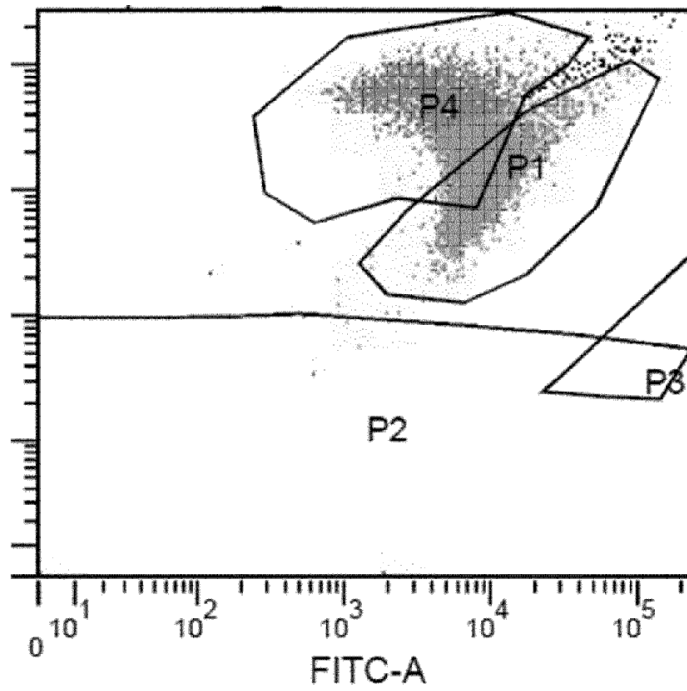


Figura 21

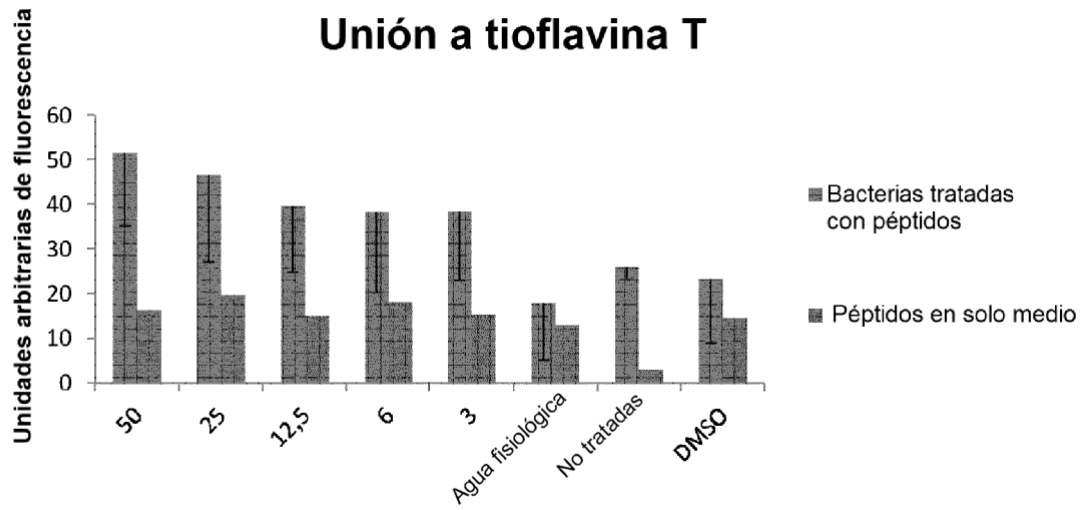


Figura 22

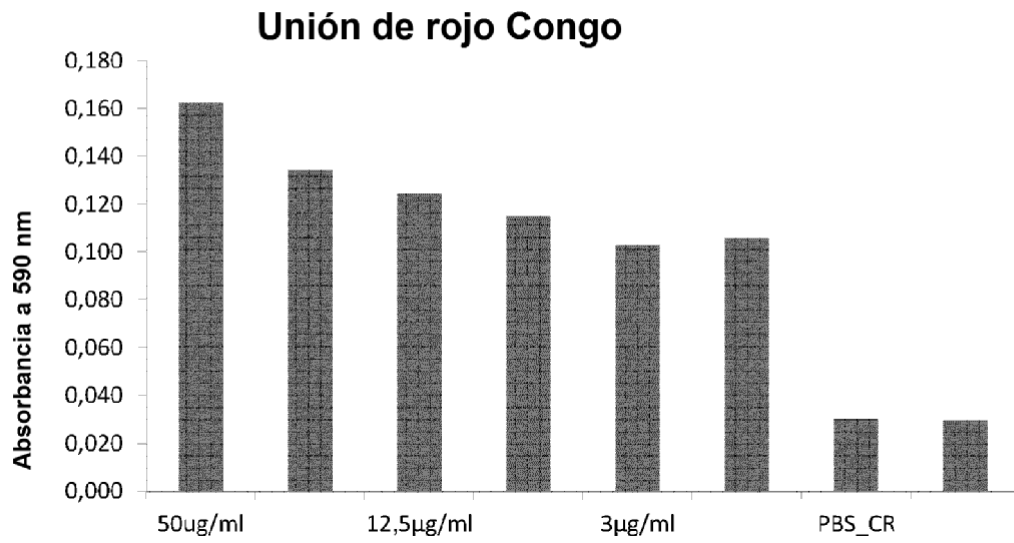
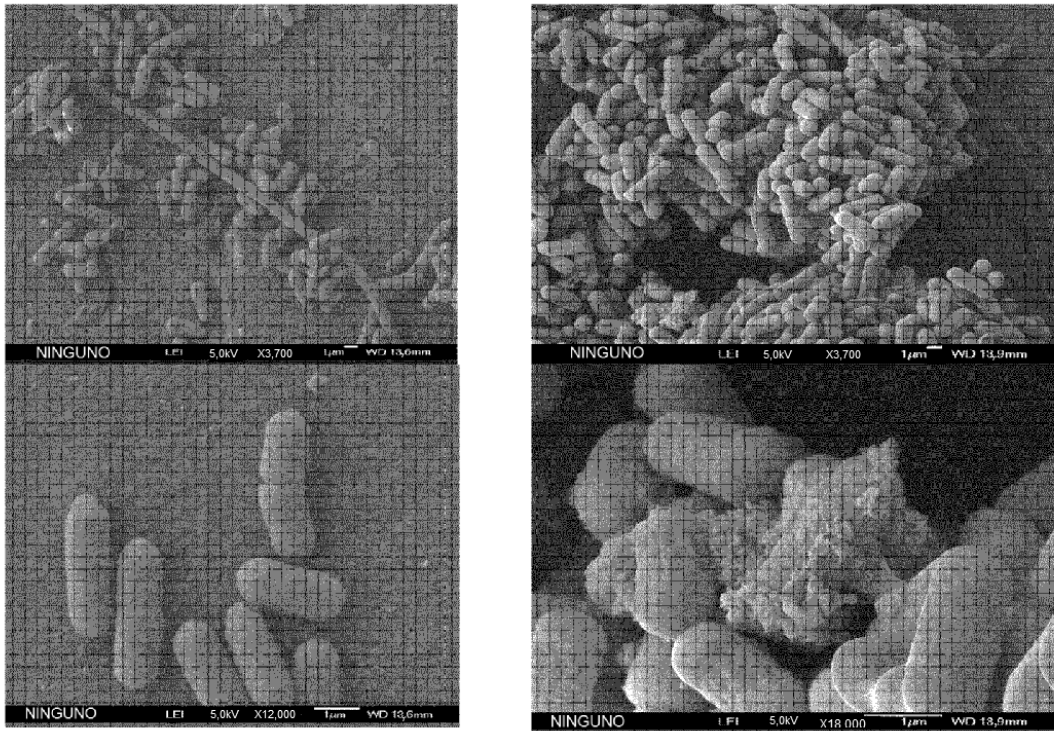


Figura 23



Bacillus cereus no tratadas

Tratadas con C30 (25 µg/ml)
durante 5 minutos

Figura 24

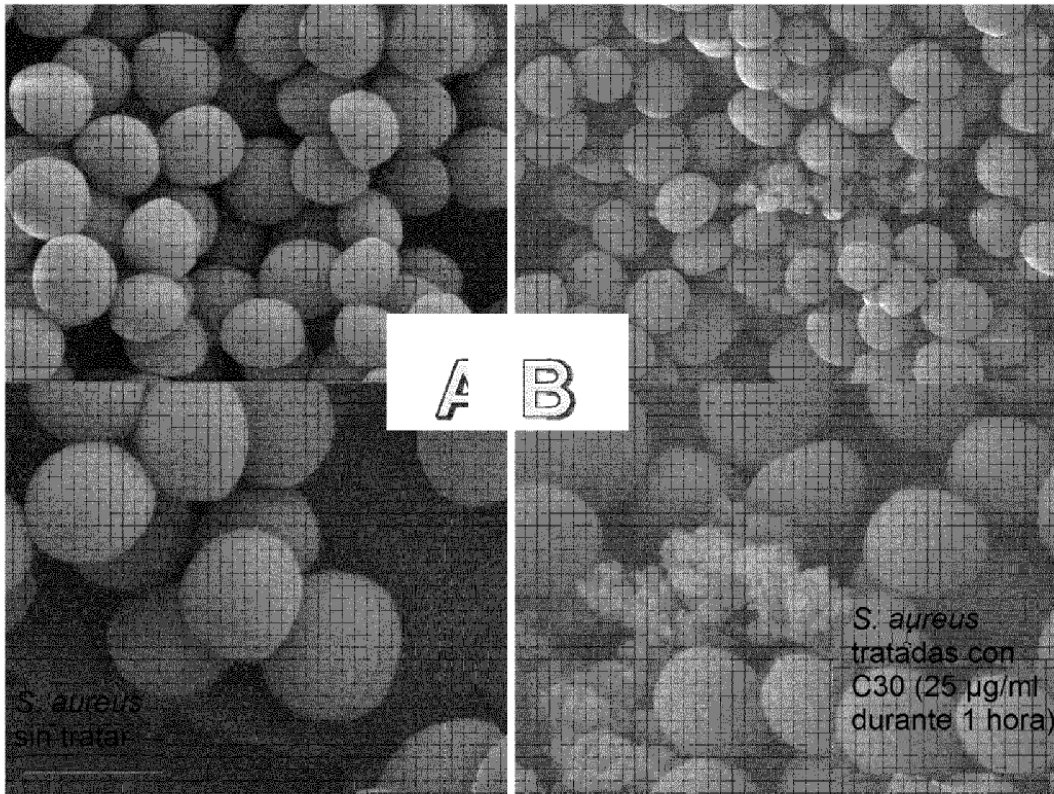
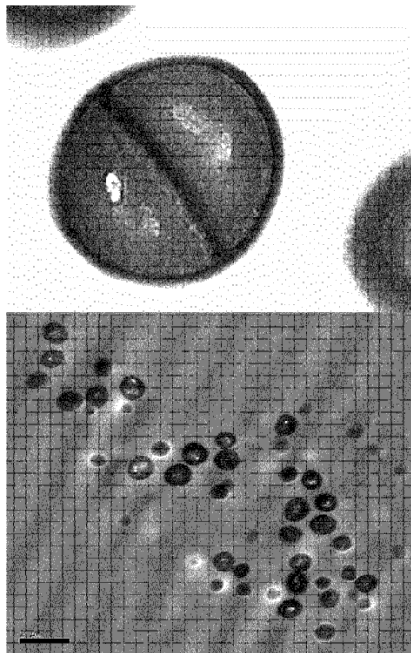
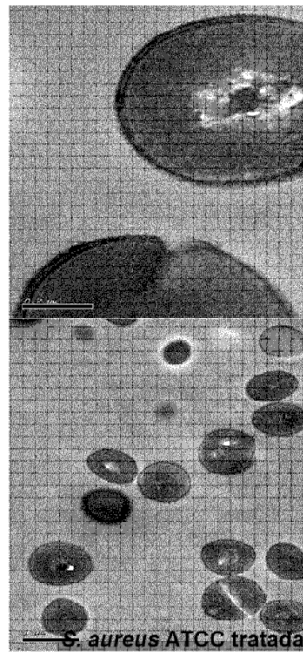


Figura 25



S. aureus ATCC tratadas con DMSO



S. aureus ATCC tratadas con C30, 25 µg/ml
incubadas durante 20 min

Figura 26

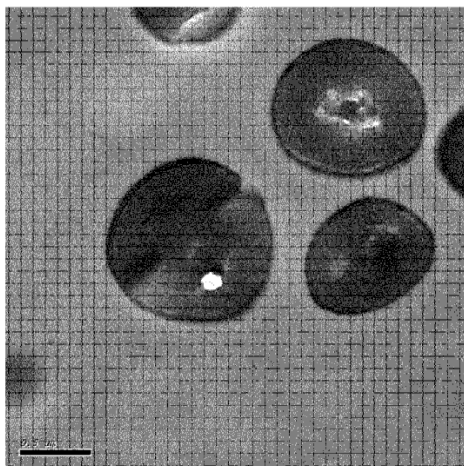


Figura 27

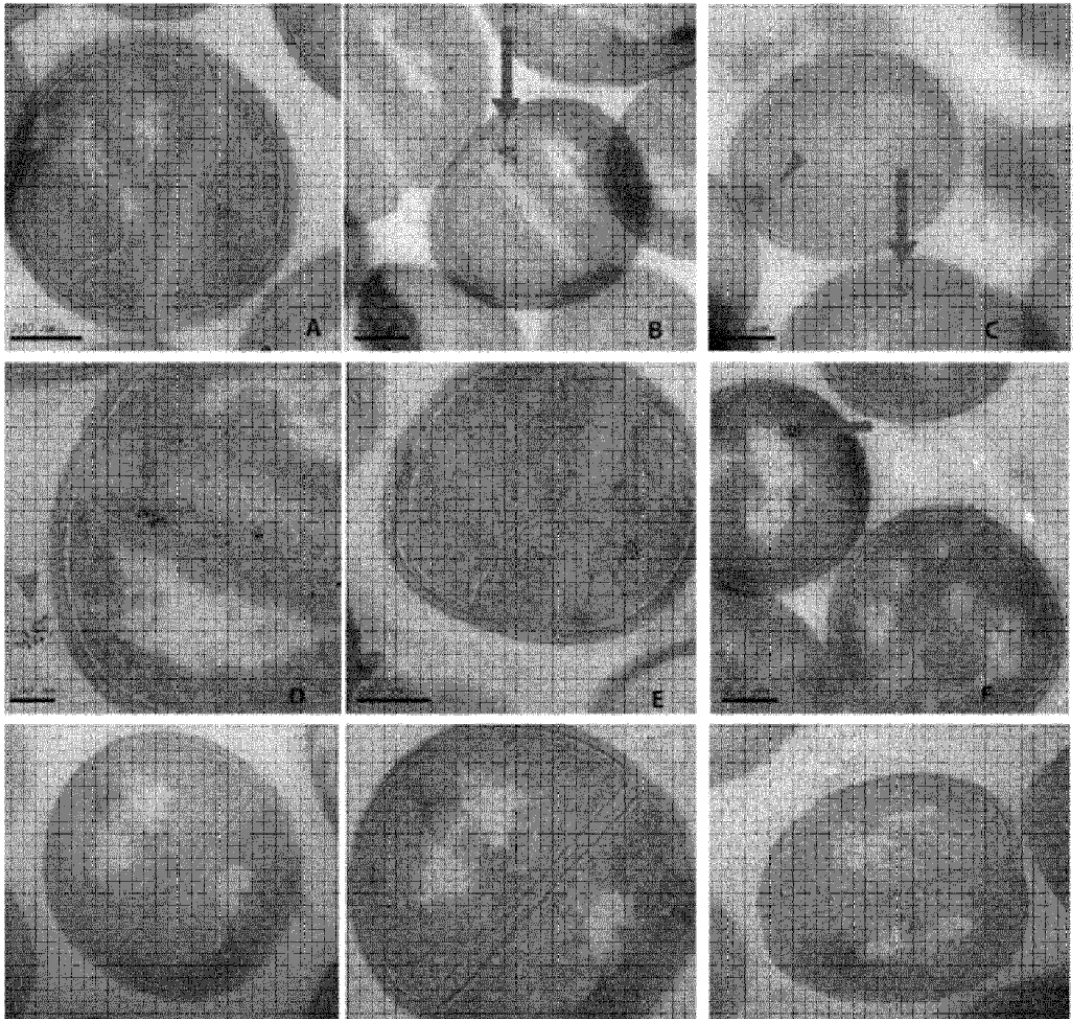


Figura 28

Número de bacterias que residen intracelularmente en la línea celular HCT116

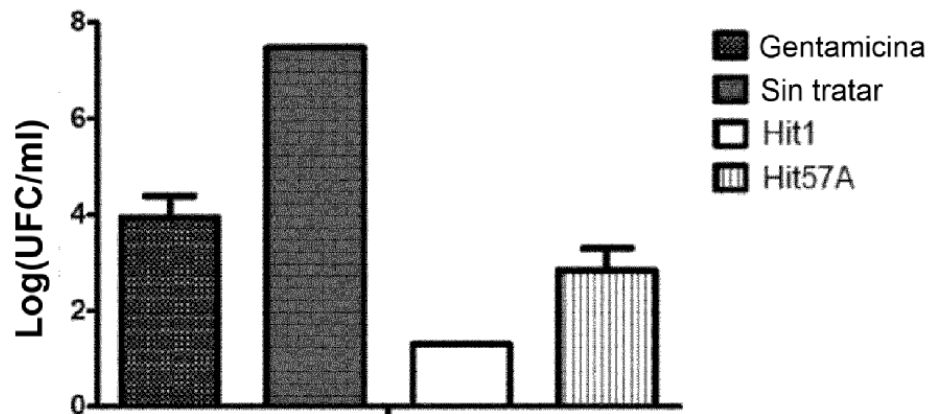
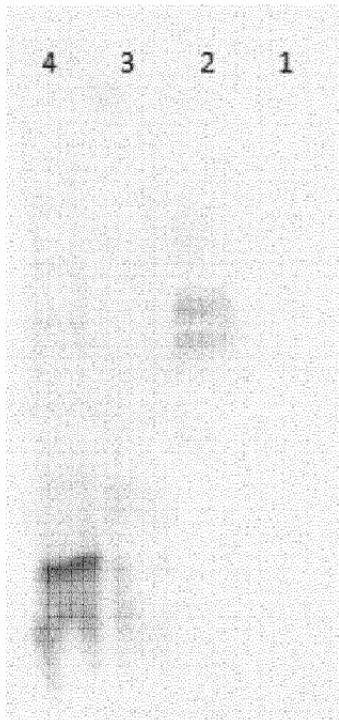


Figura 29



- 1-*B. cereus* no tratadas insoluble
- 2-*B. cereus* tratadas con C30 insoluble
- 3-*B. cereus* tratadas con C30 soluble
- 4-*B. cereus* no tratadas soluble

Figura 30

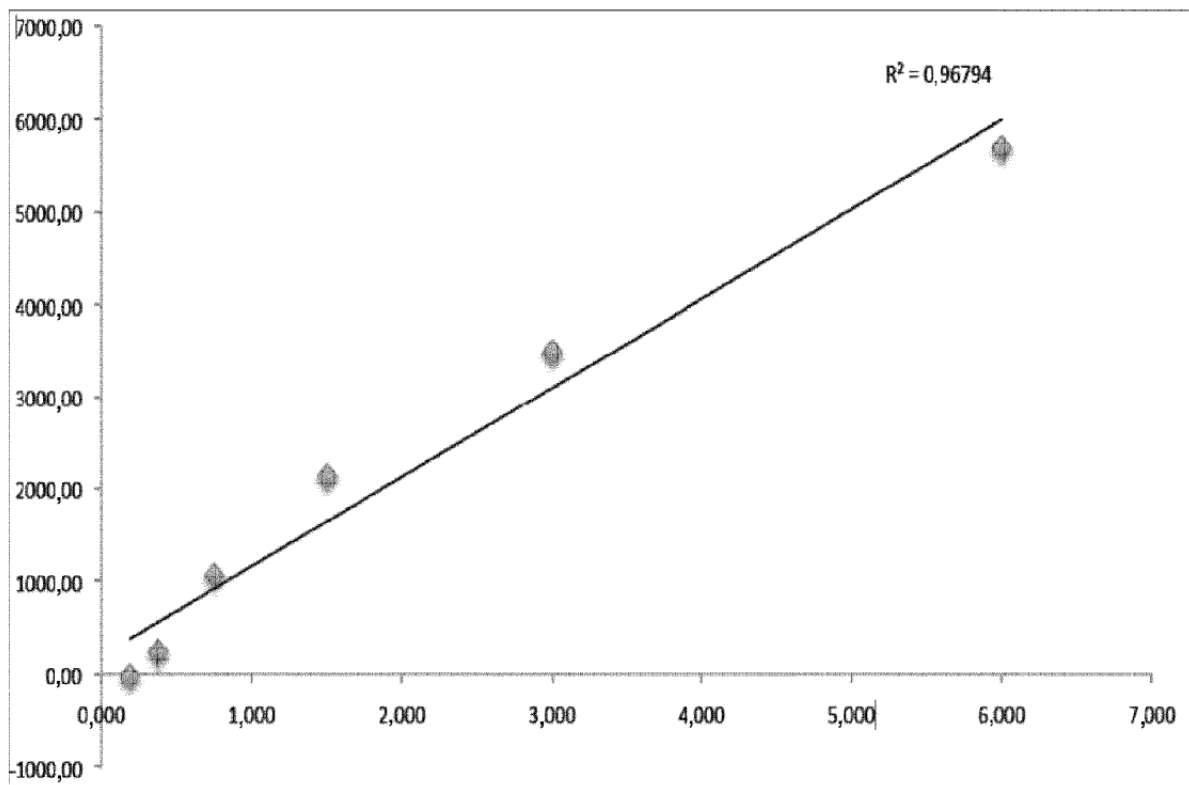


Figura 31

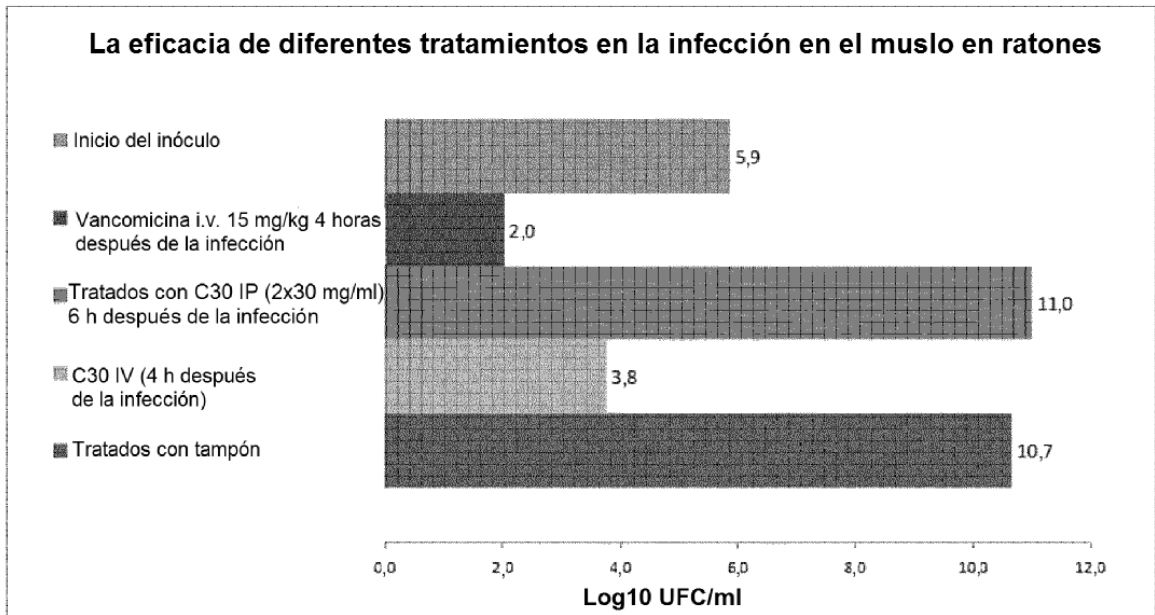
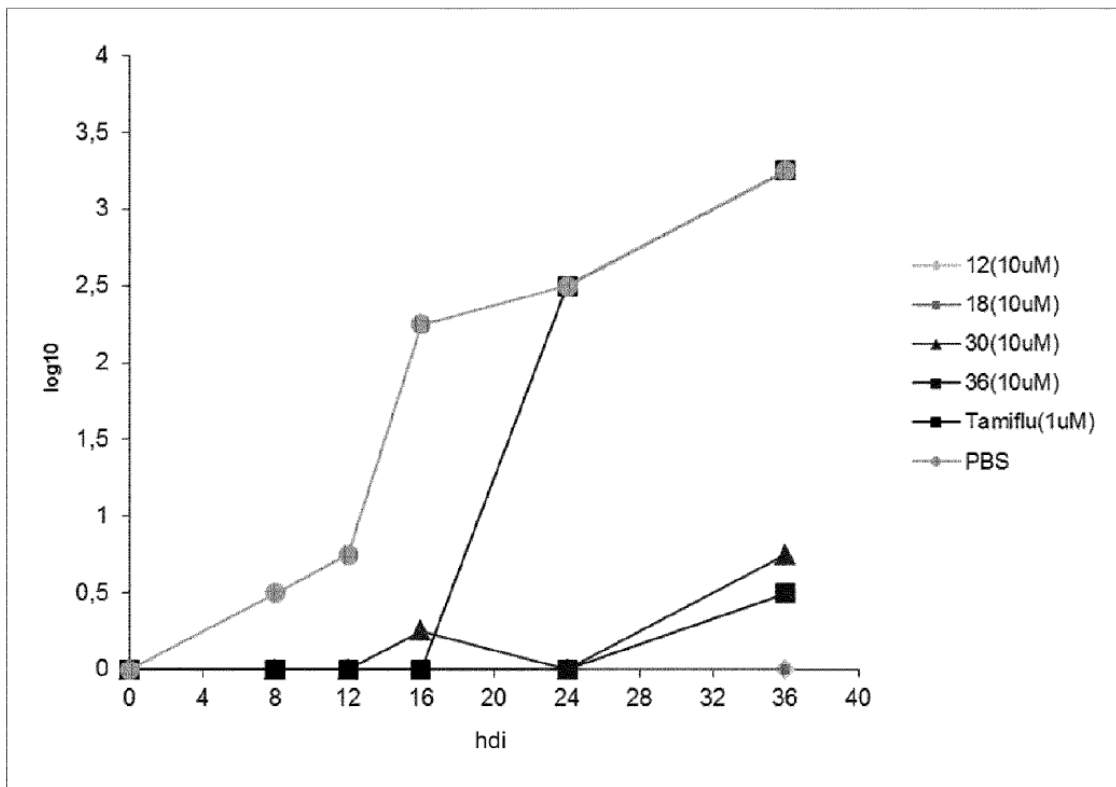
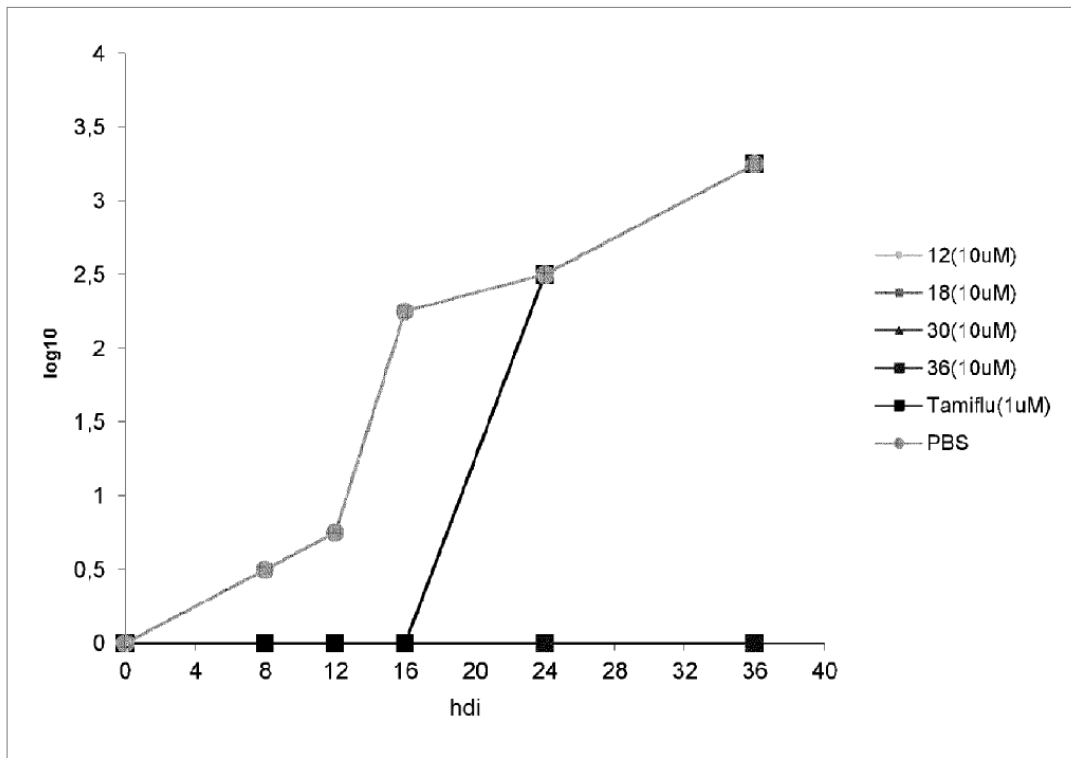


Figura 32

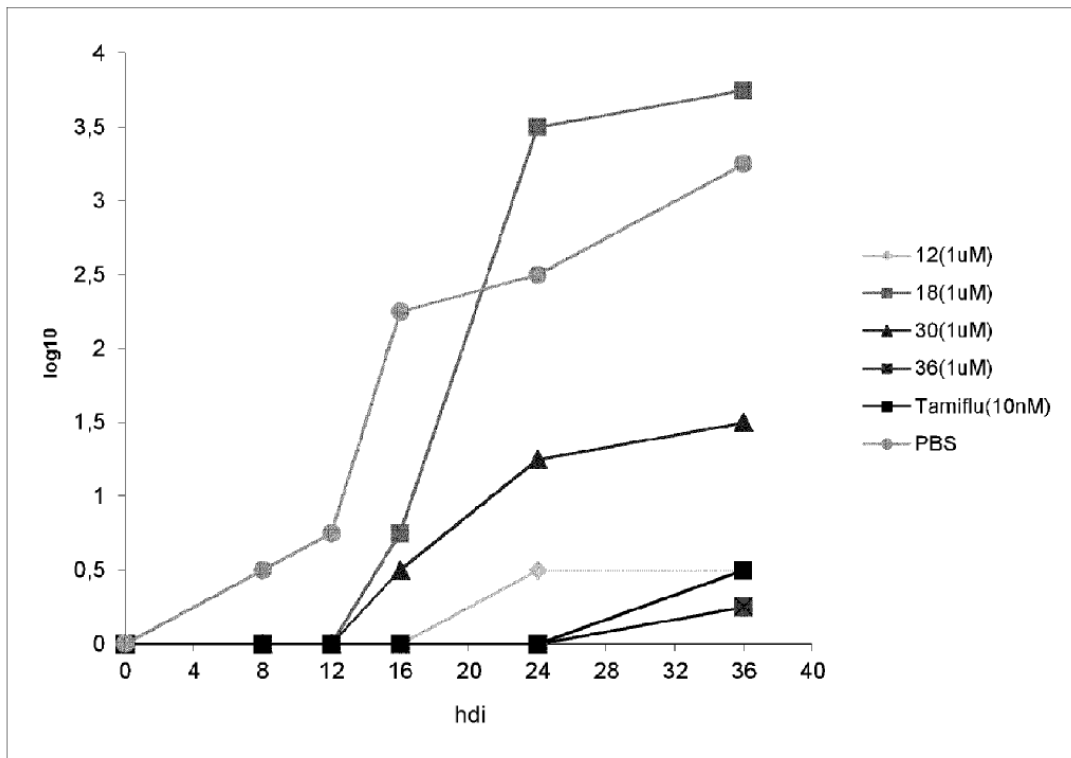
A



B



C



D

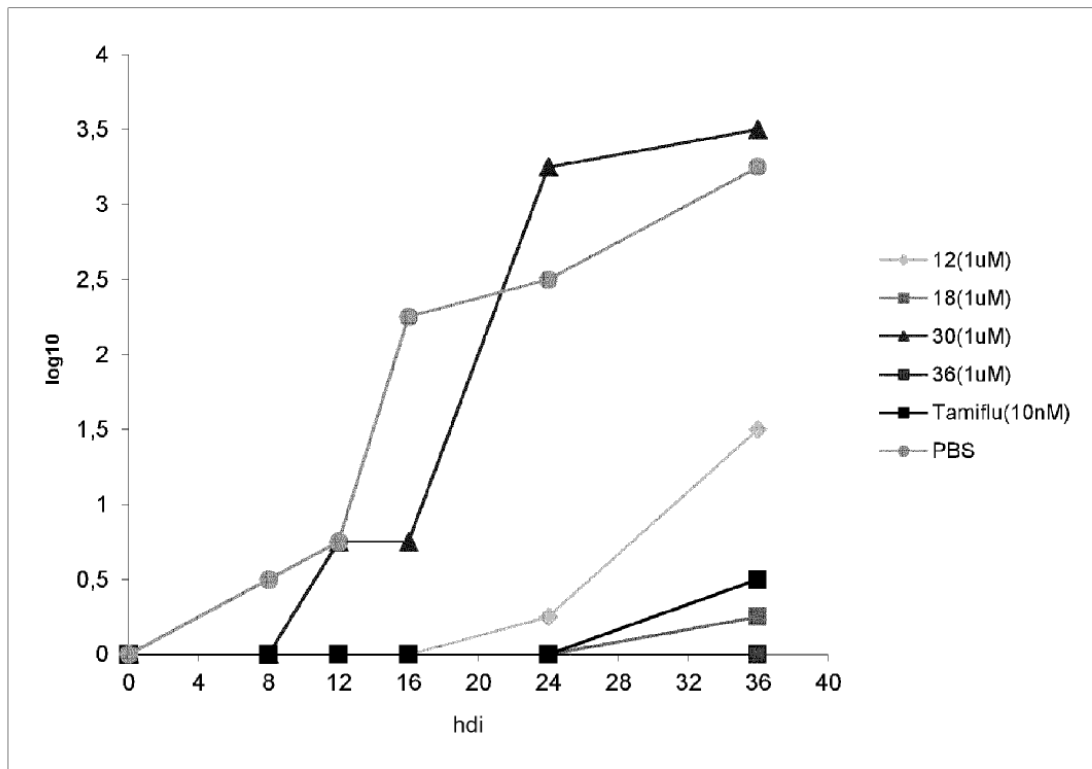


Figura 33

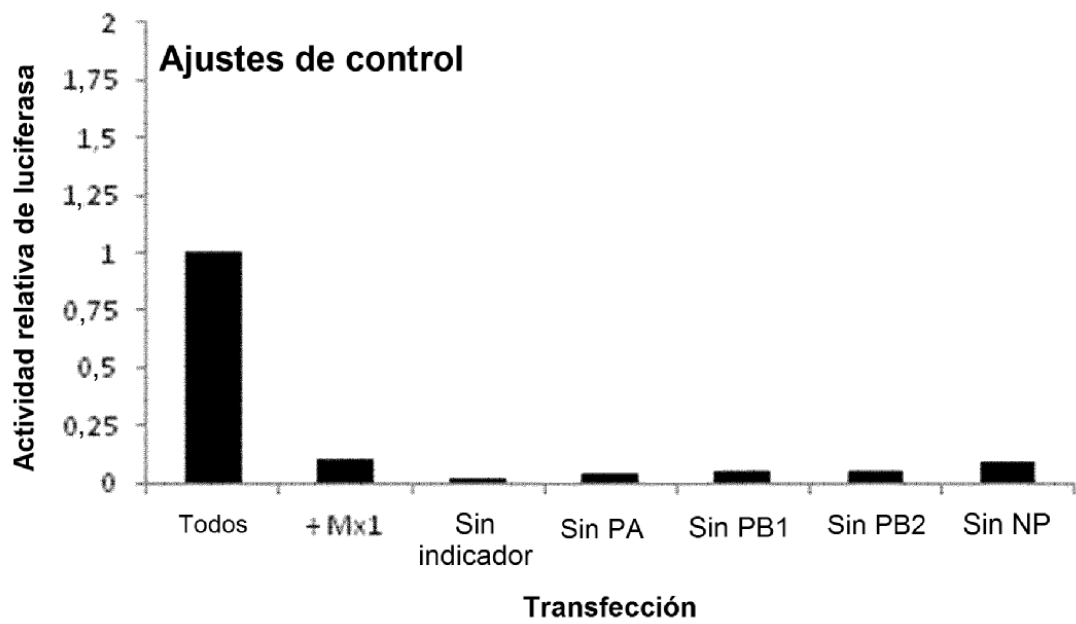
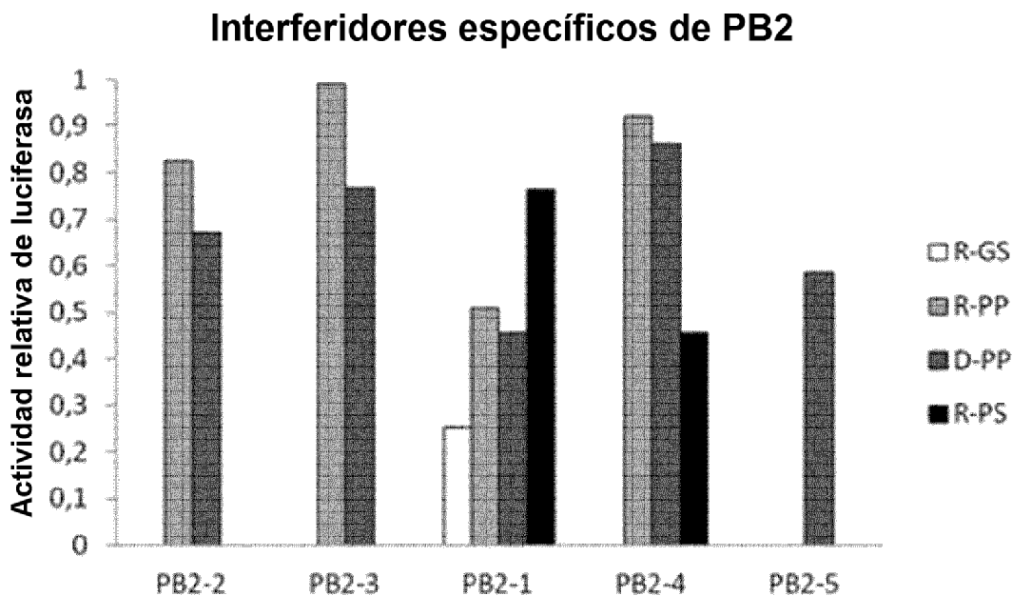
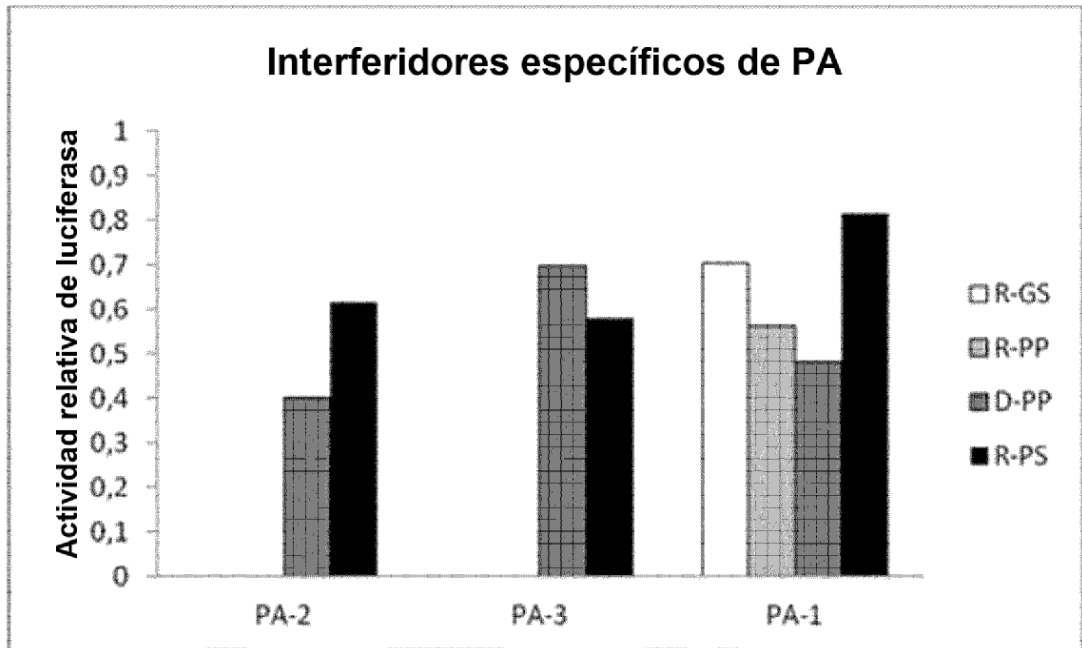


Figura 34



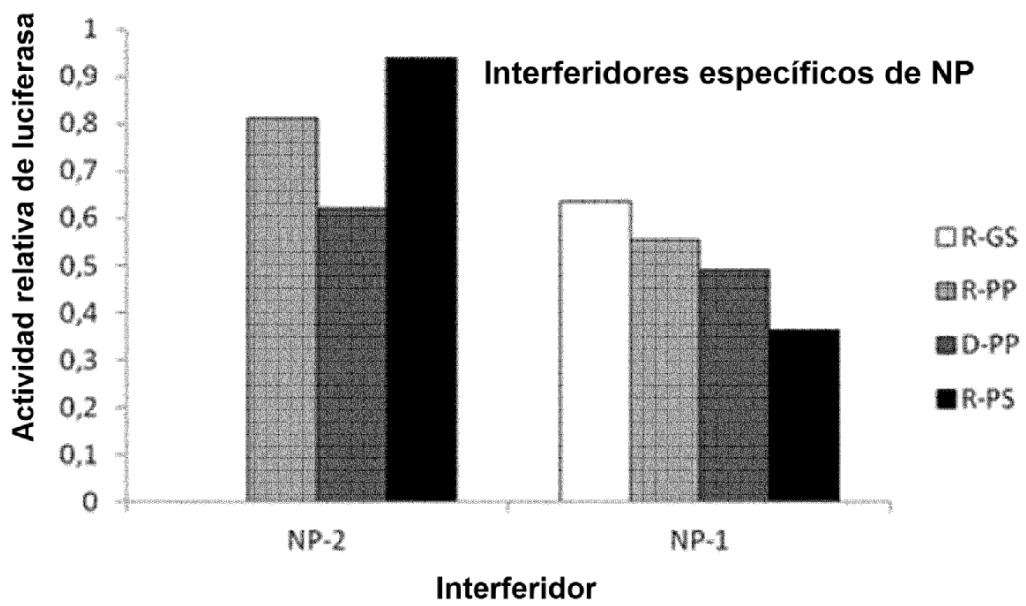
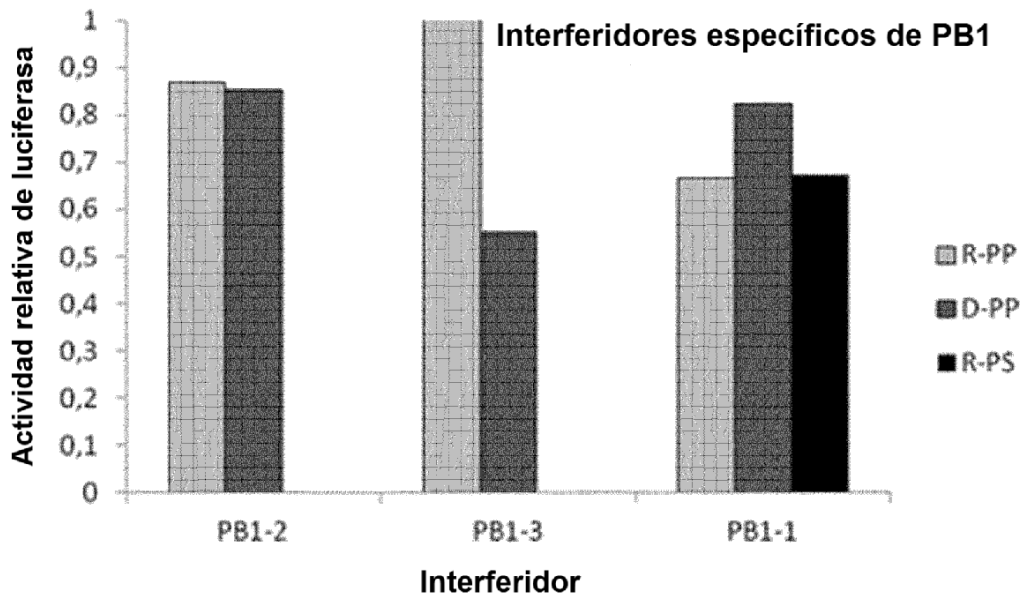


Figura 35

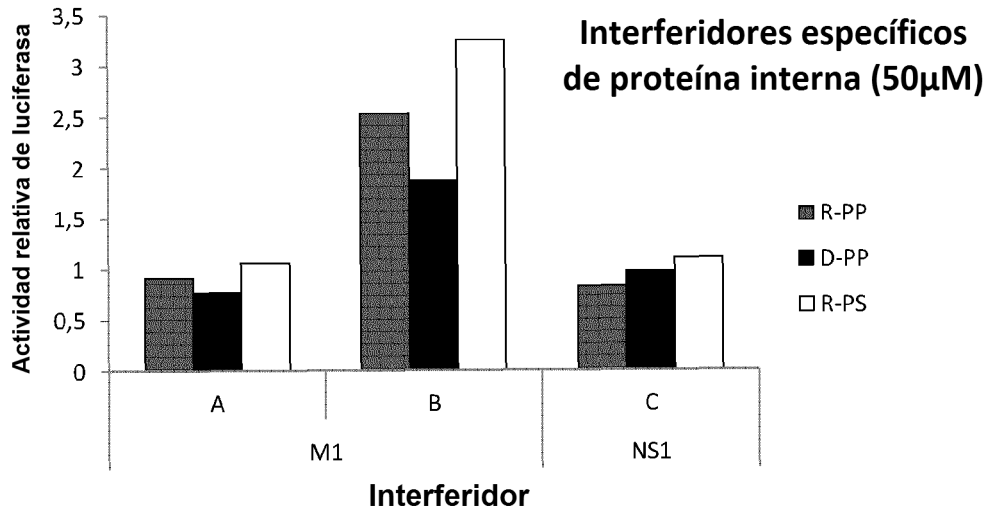


Figura 36

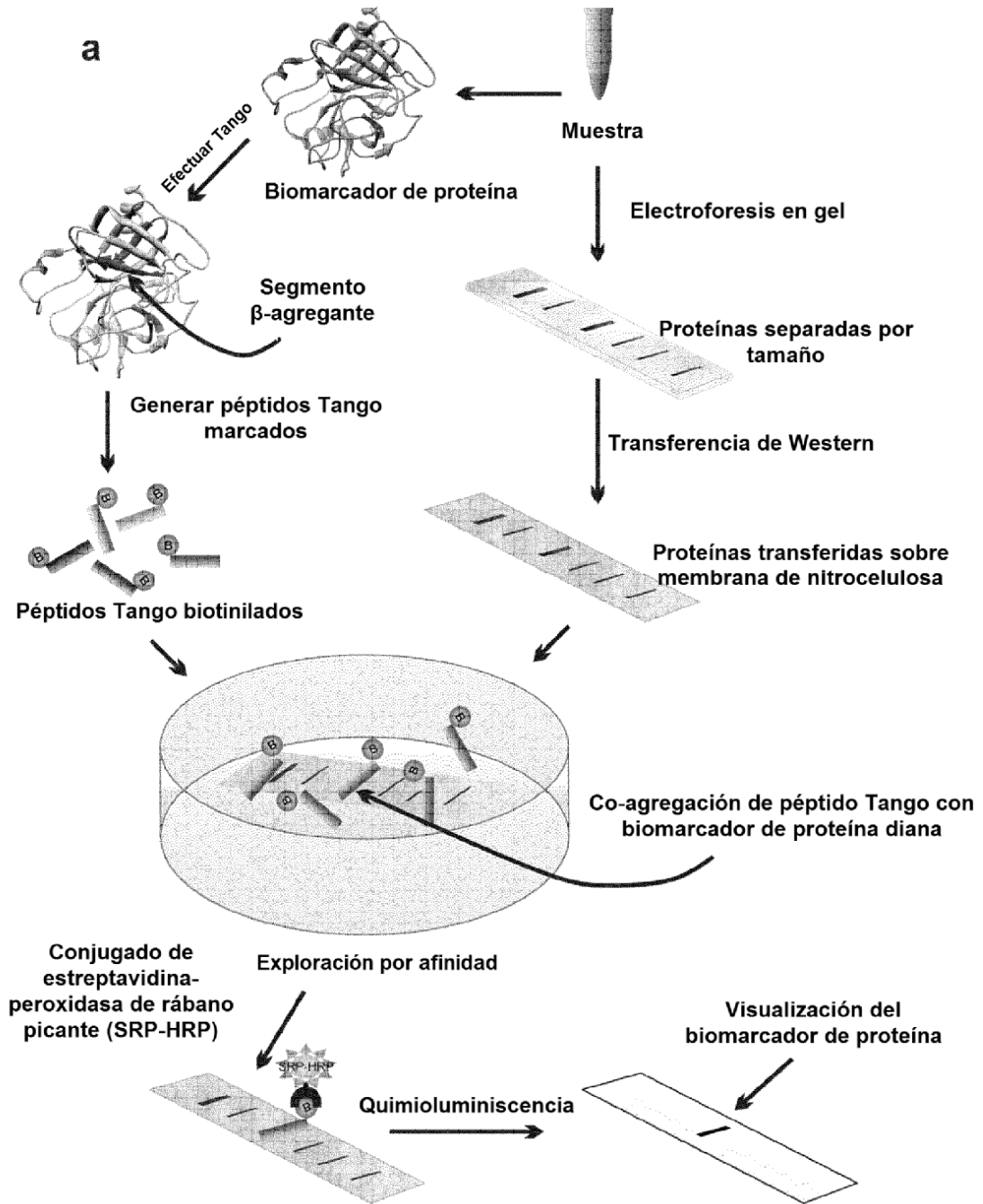


Figura 37

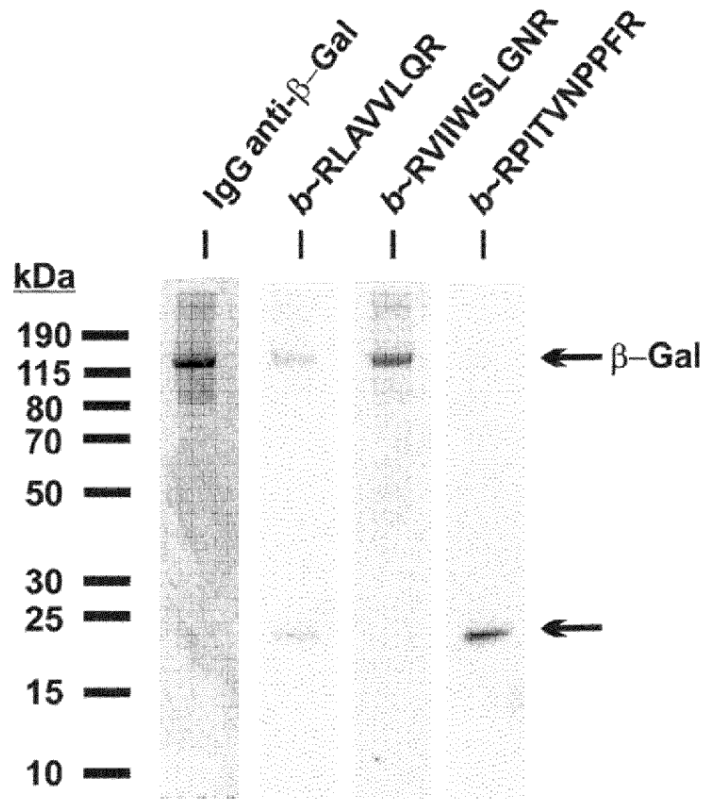


Figura 38

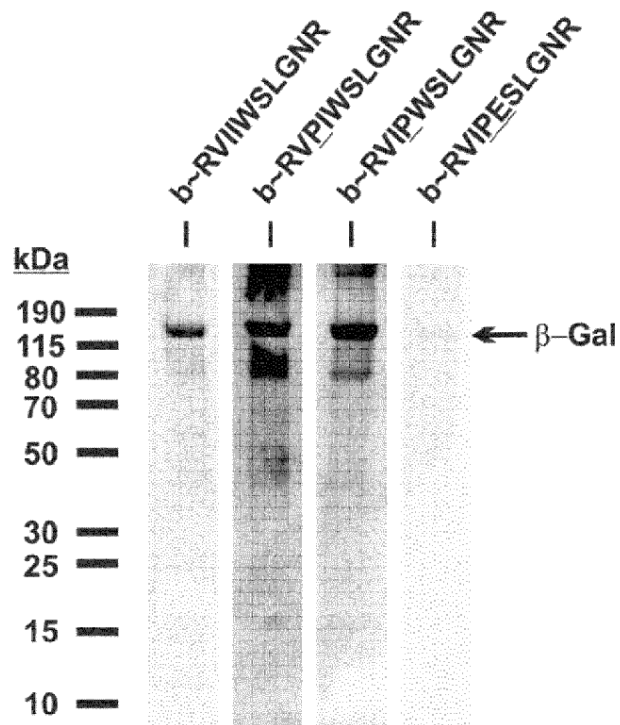


Figura 39

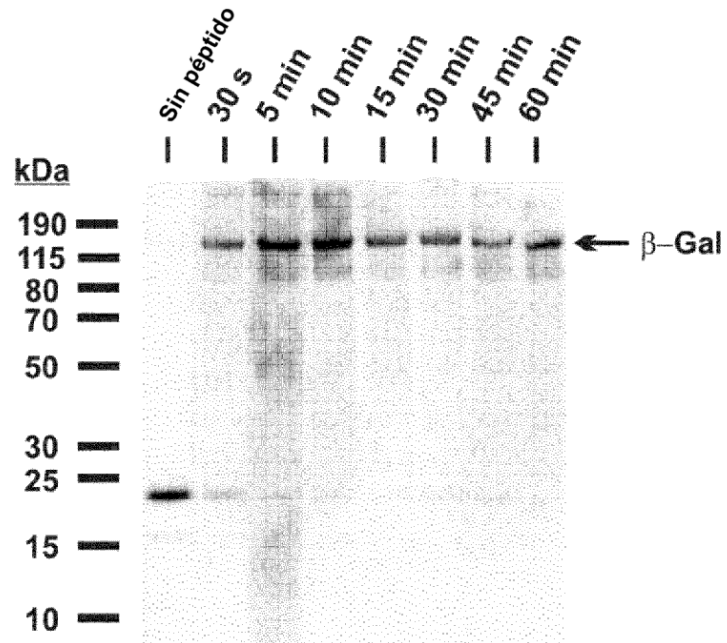
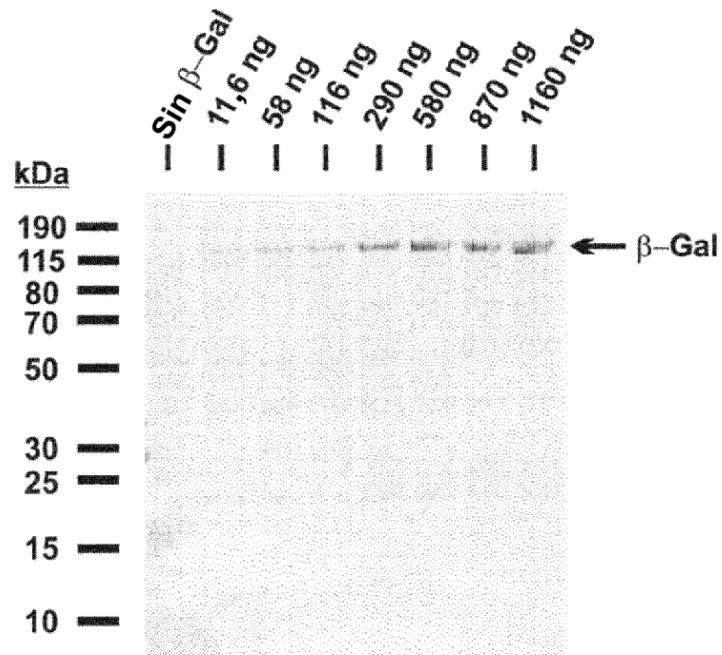


Figura 40

A



B

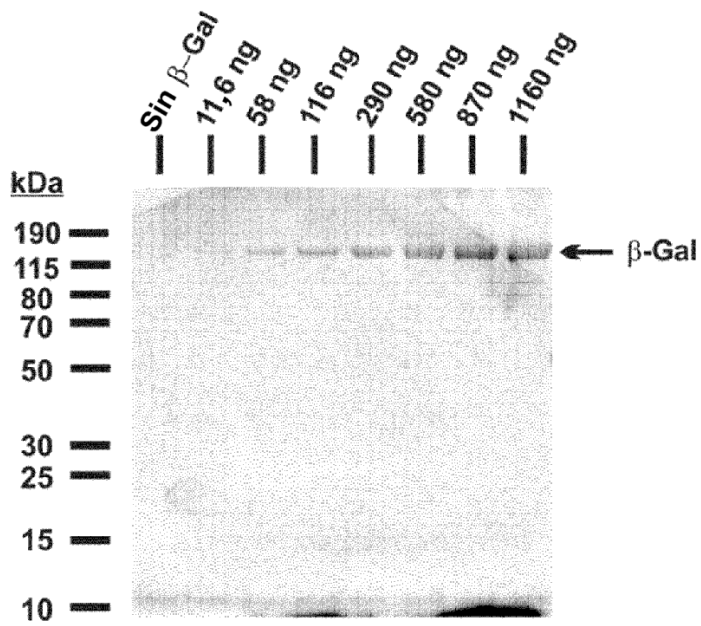


Figura 41

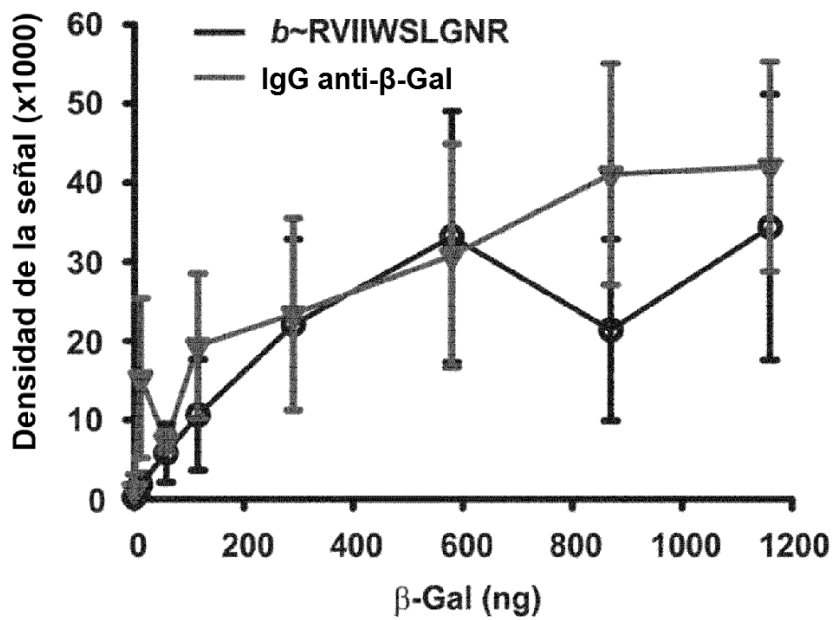


Figura 42

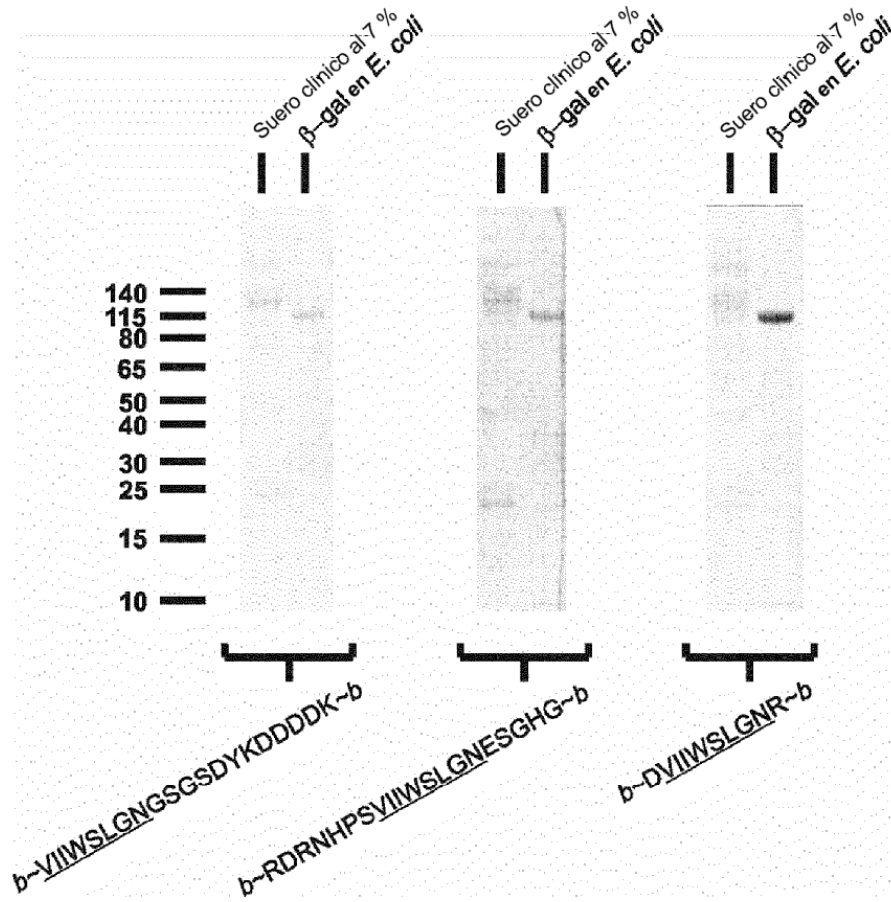


Figura 43

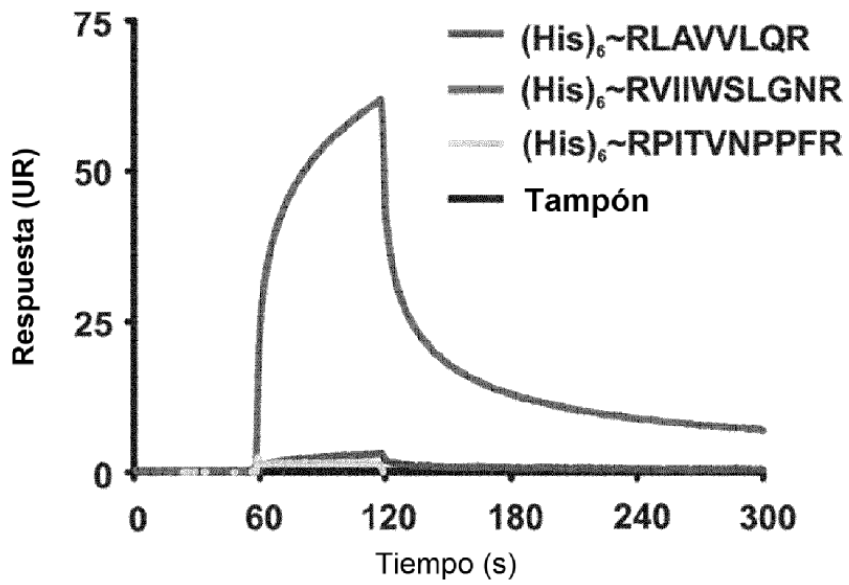


Figura 44

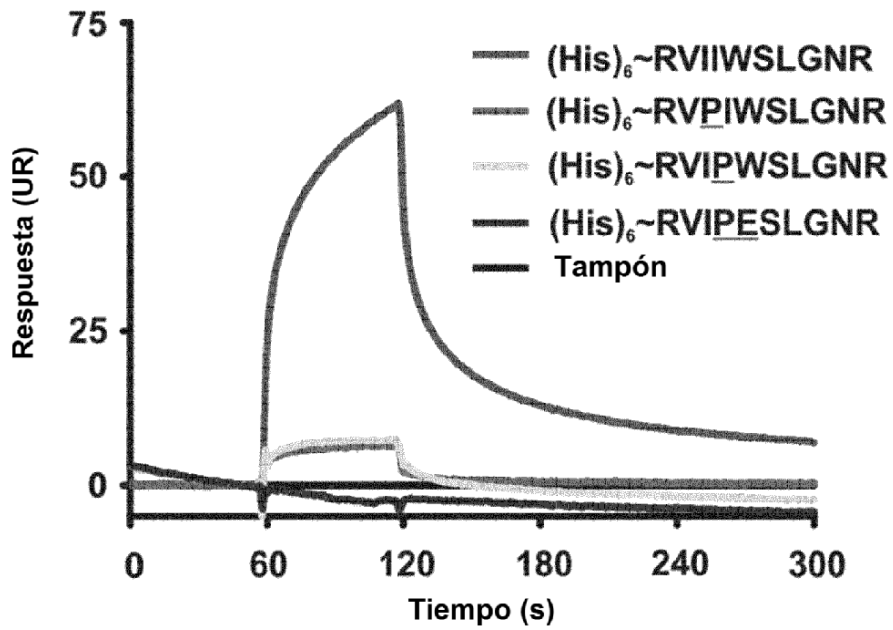


Figura 45

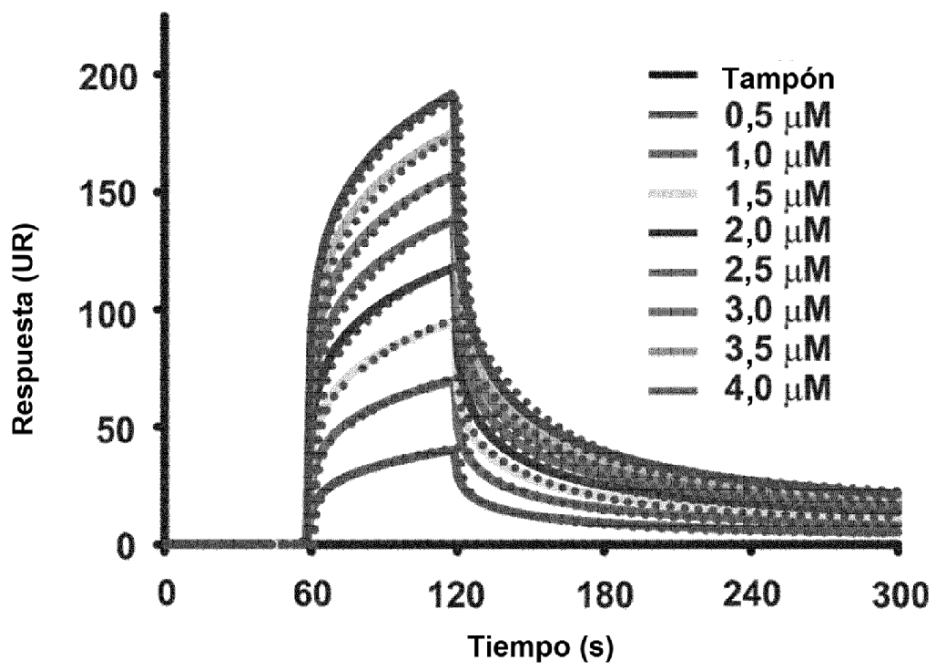


Figura 46

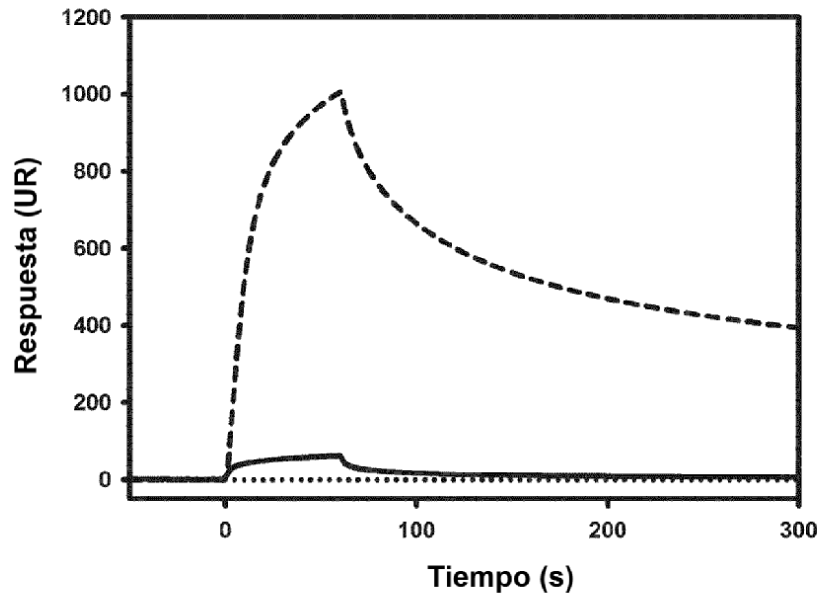


Figura 47

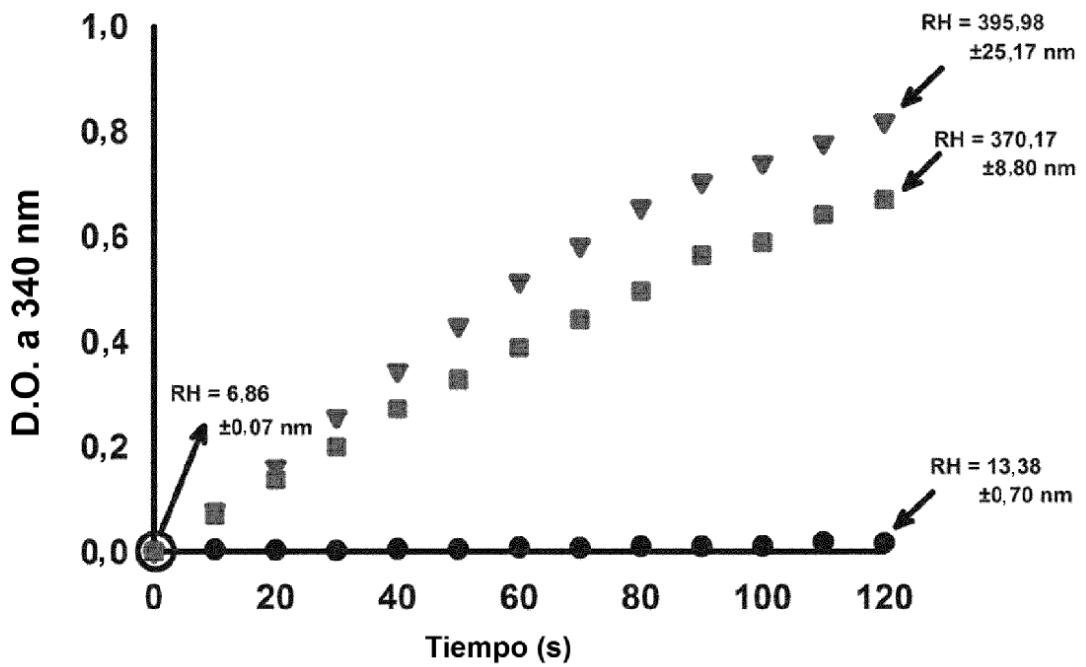


Figura 48

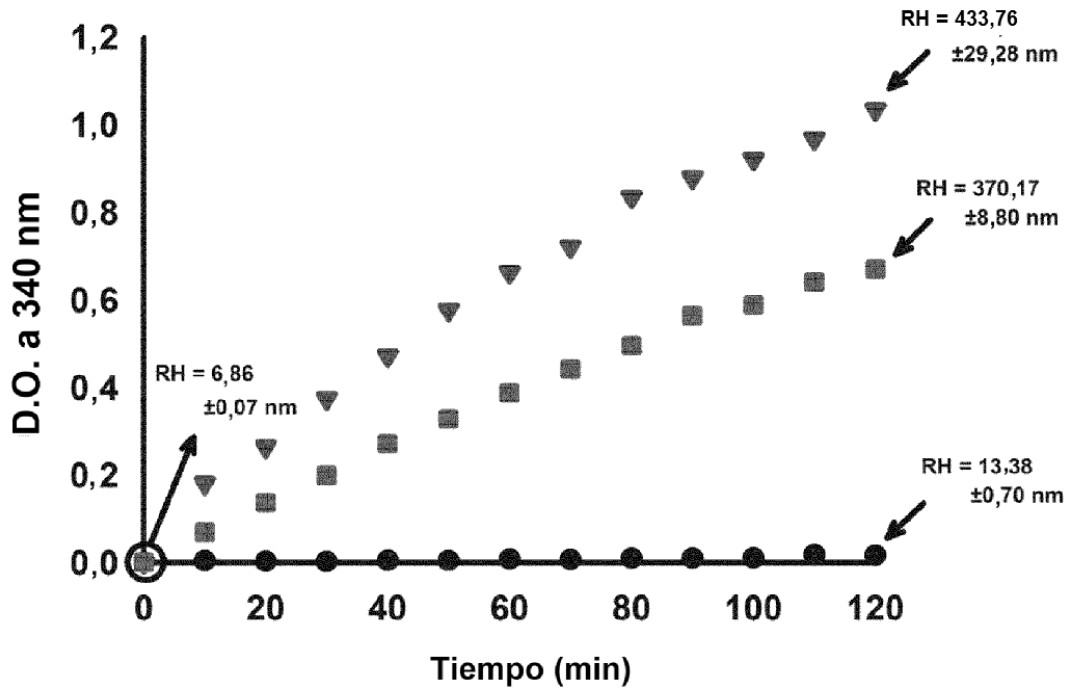


Figura 49

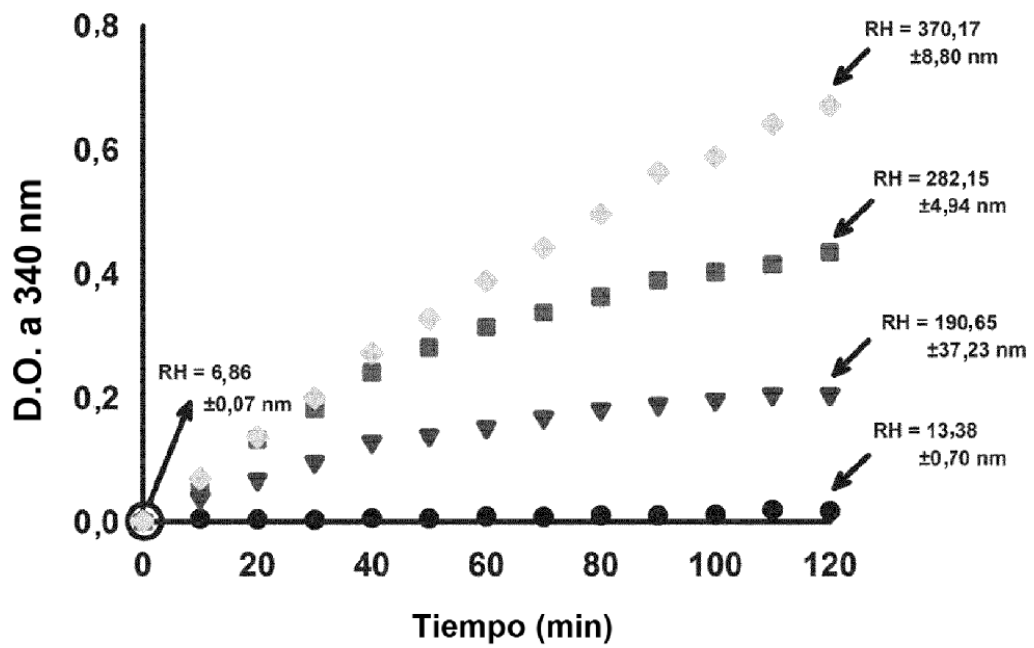


Figura 50

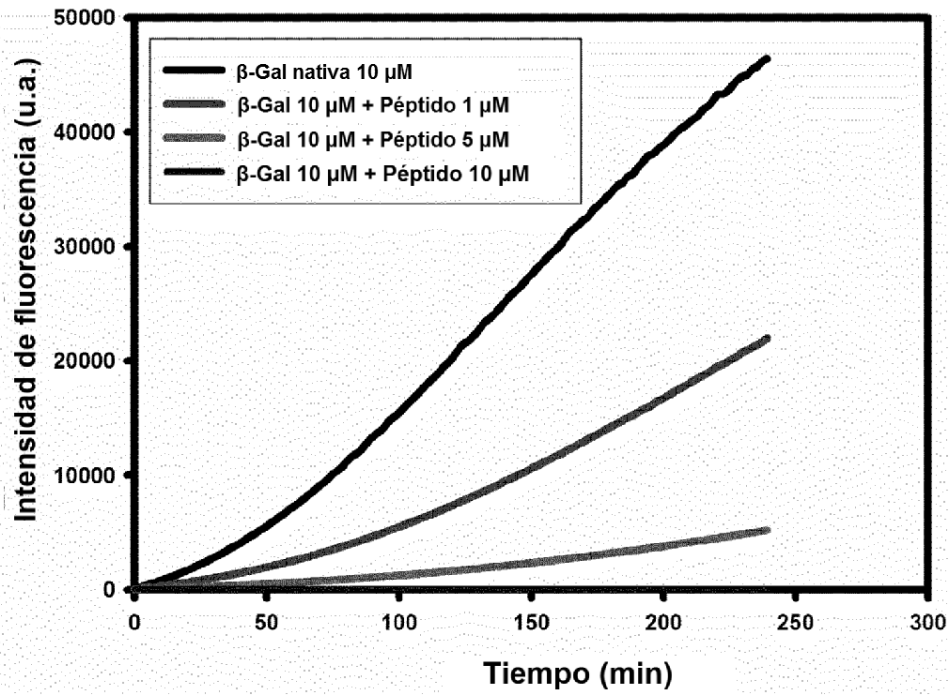


Figura 51

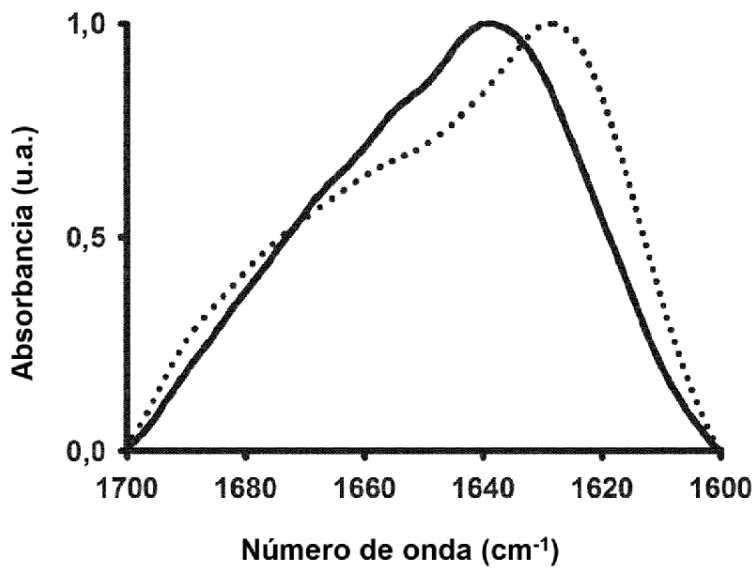


Figura 52

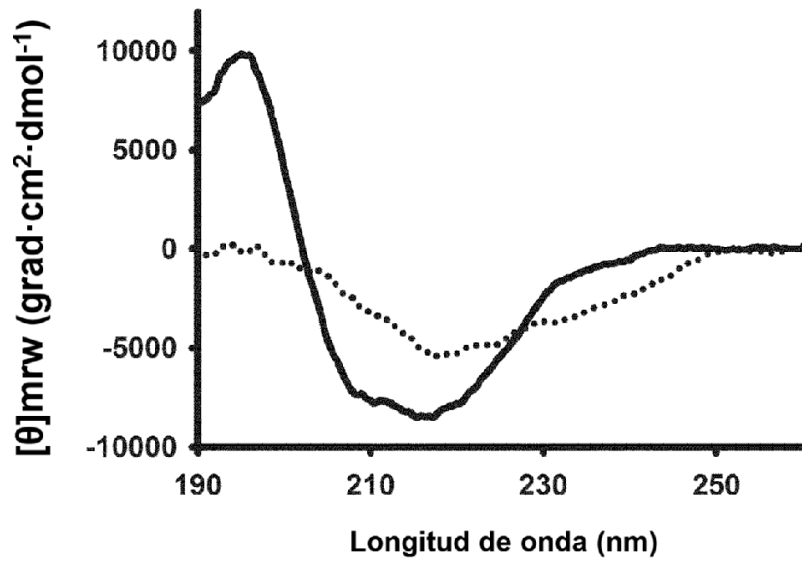


Figura 53

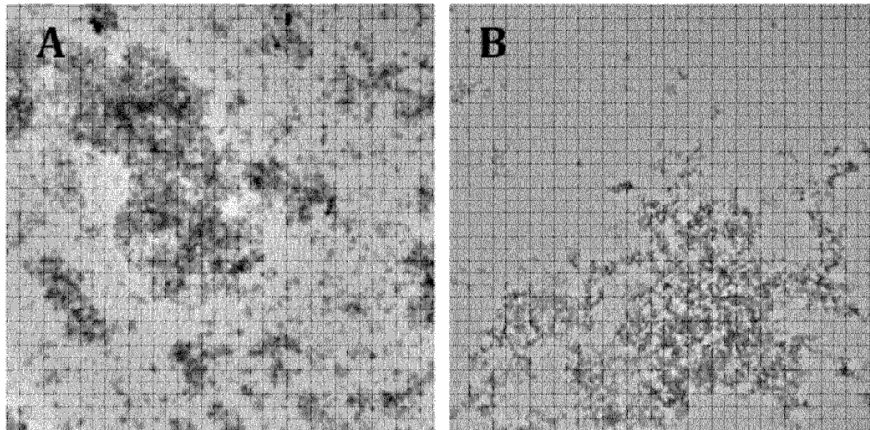


Figura 54

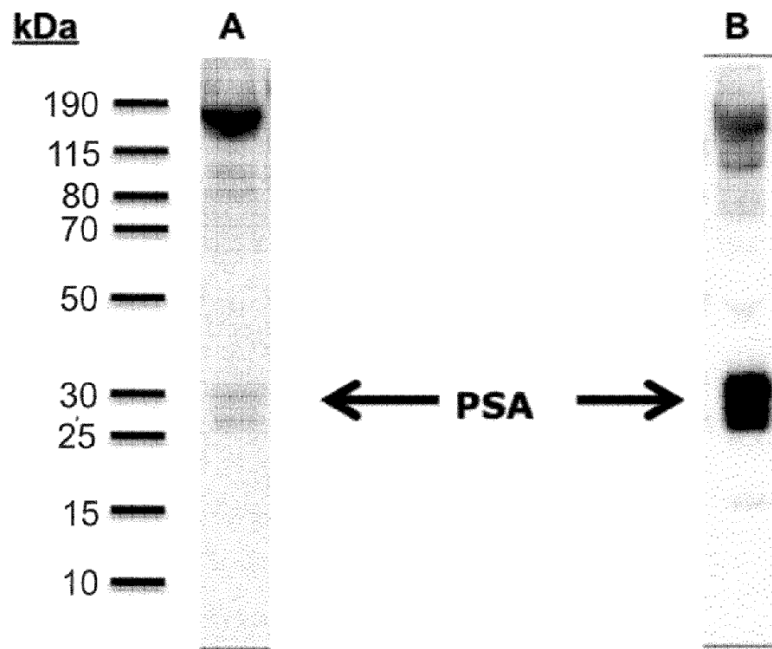


Figura 55

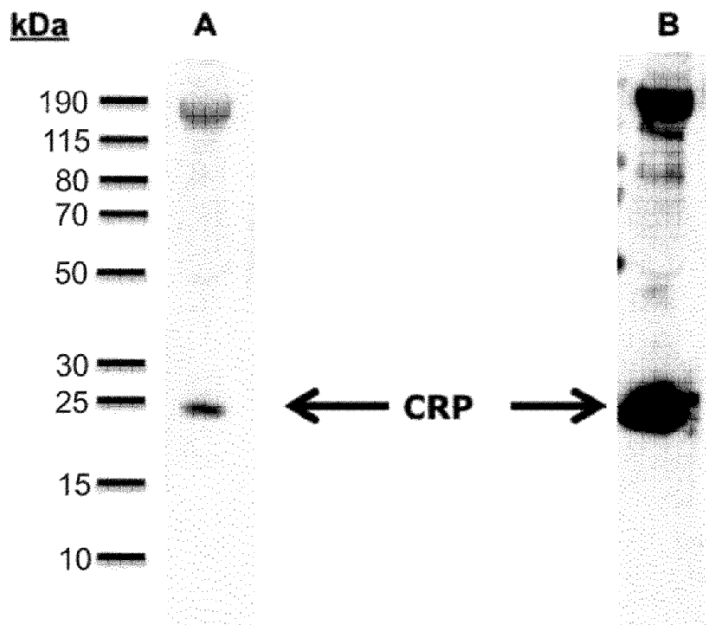


Figura 56

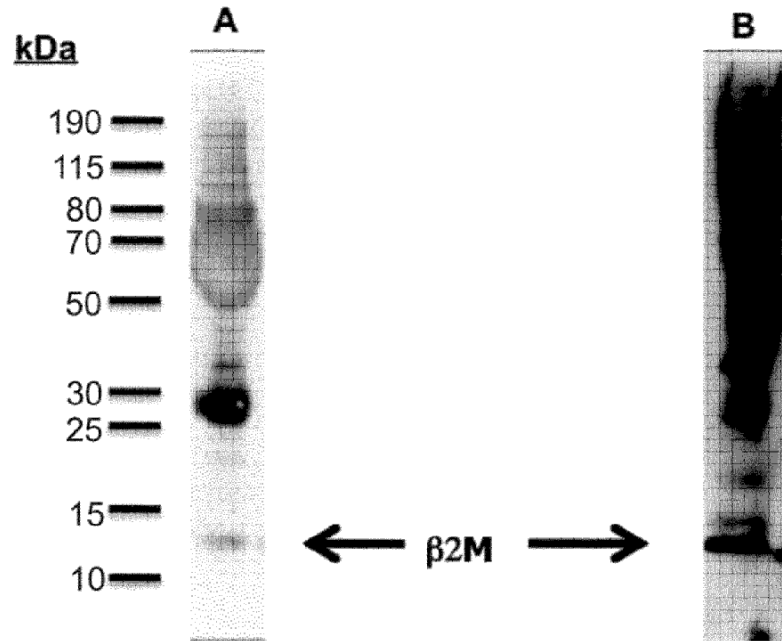


Figura 57

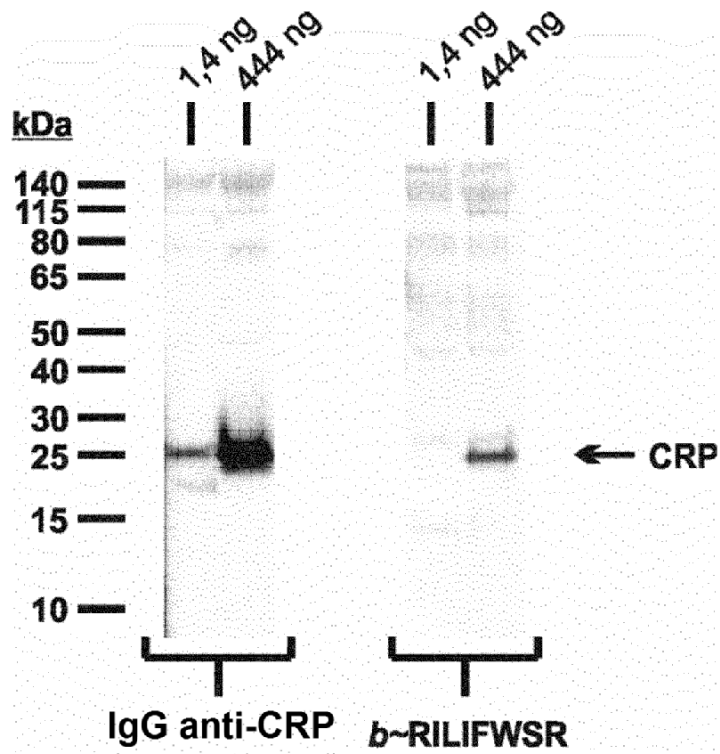


Figura 58

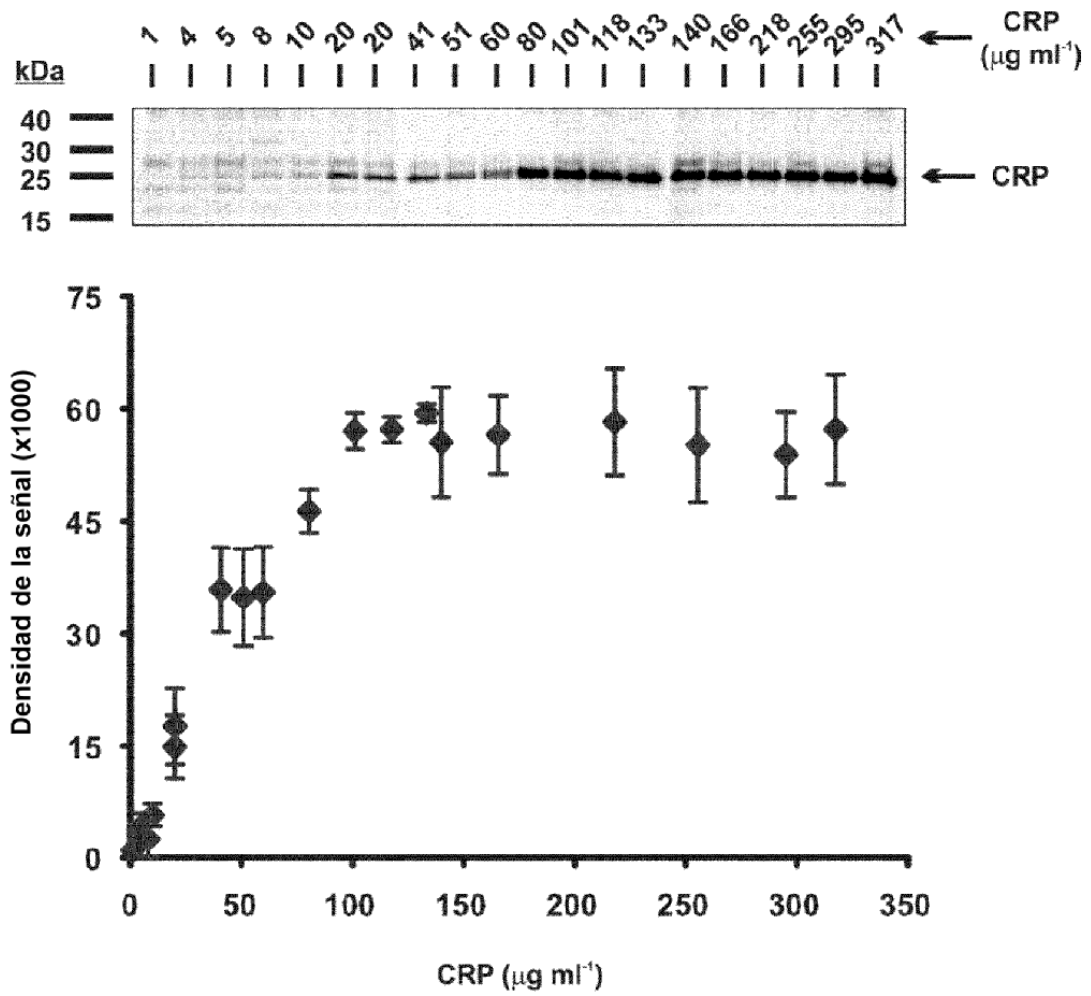


Figura 59

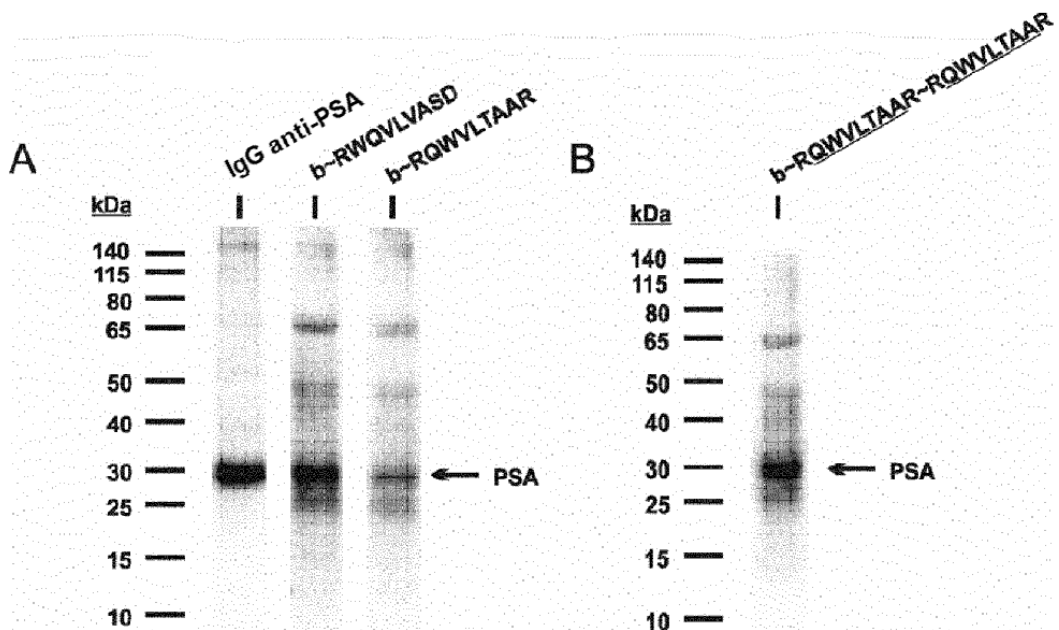


Figura 60

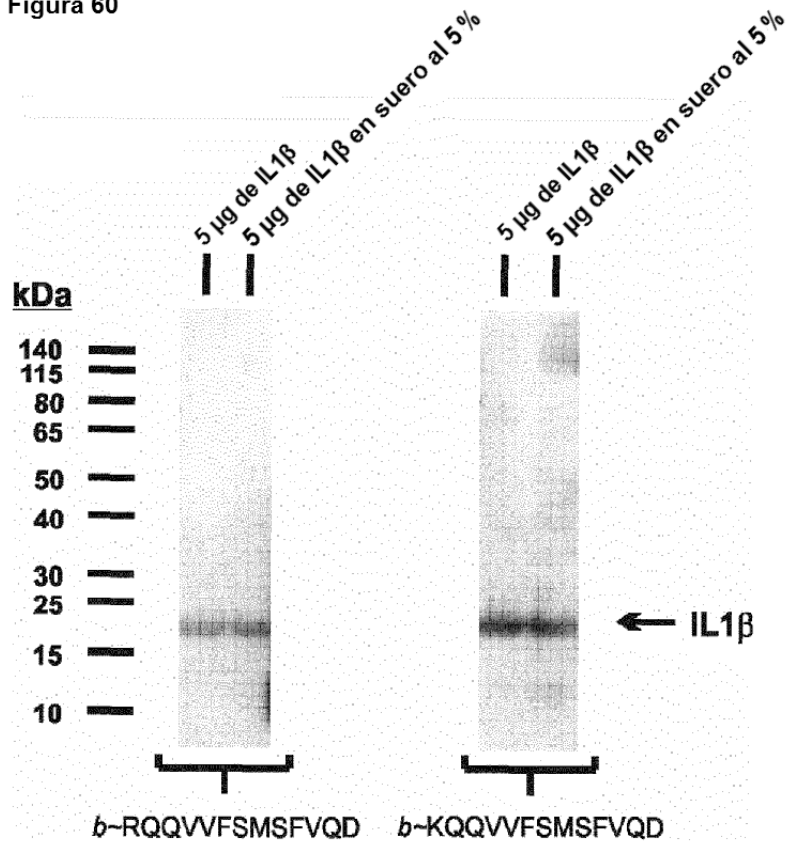


Figura 61

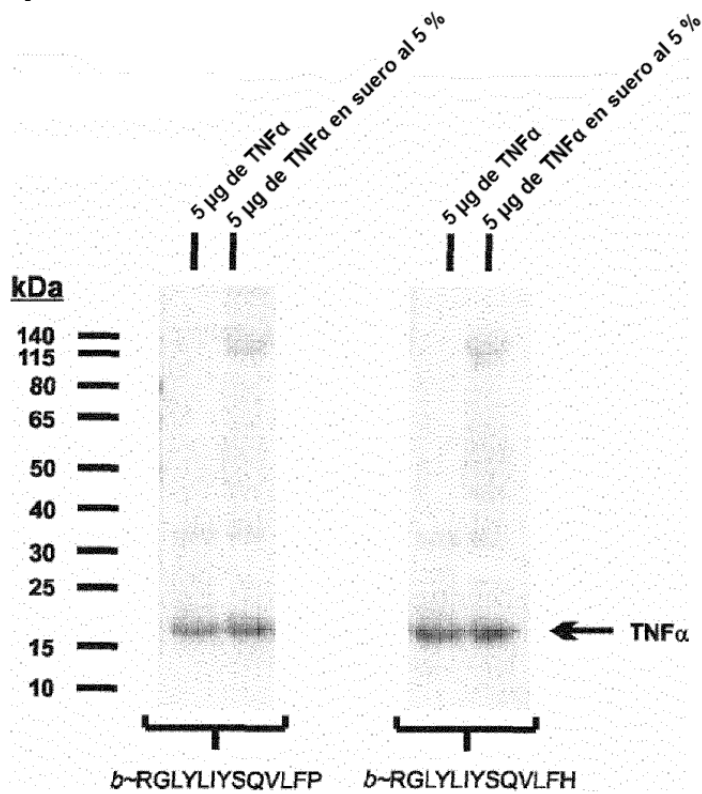


Figura 62

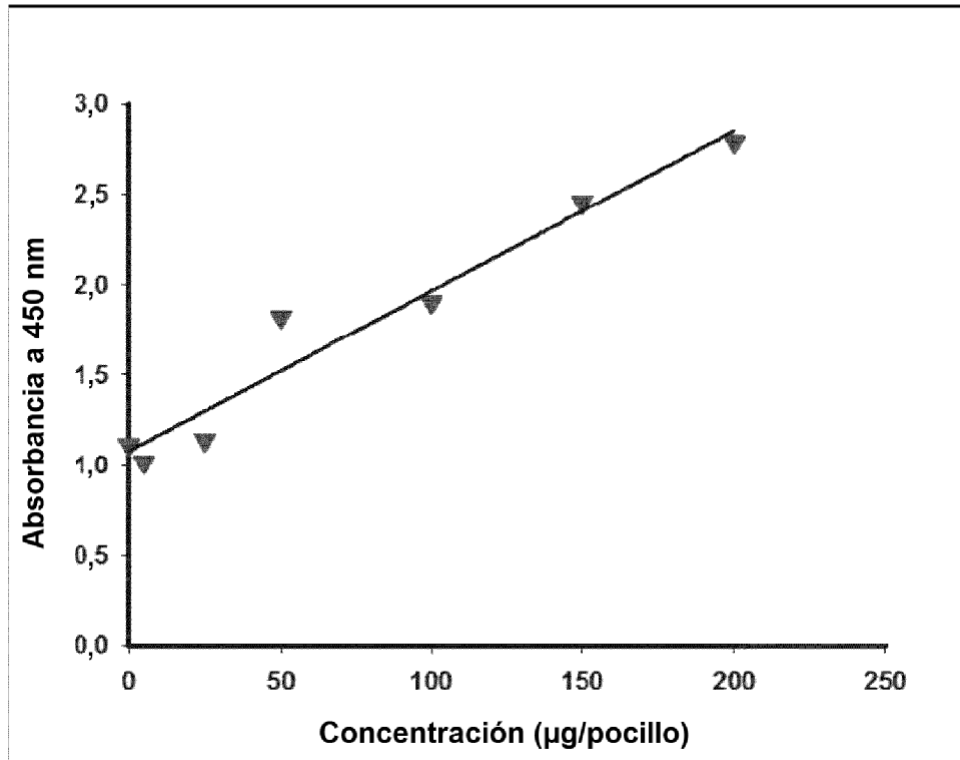


Figura 63

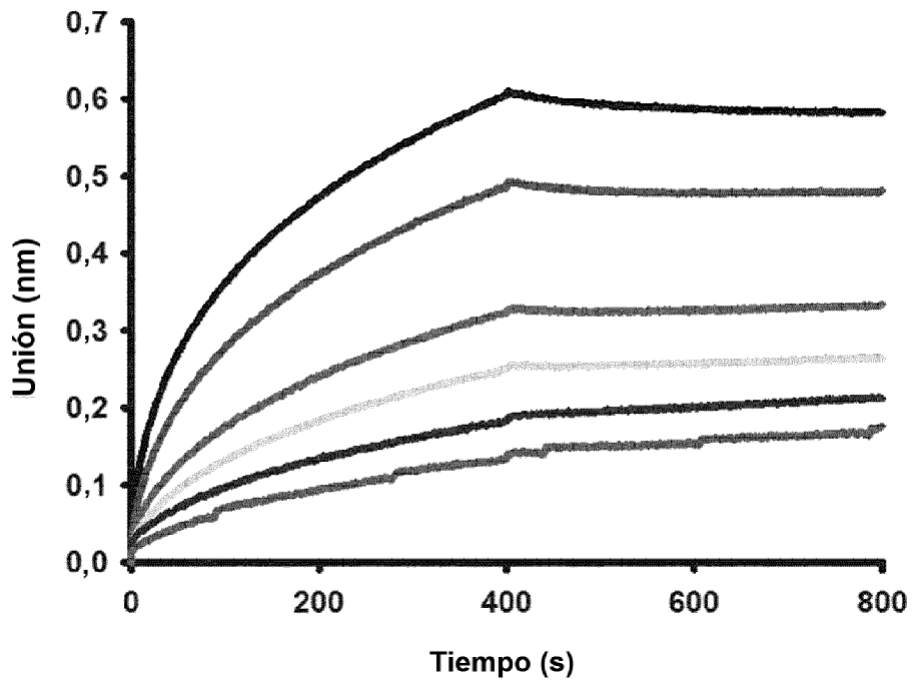


Figura 64

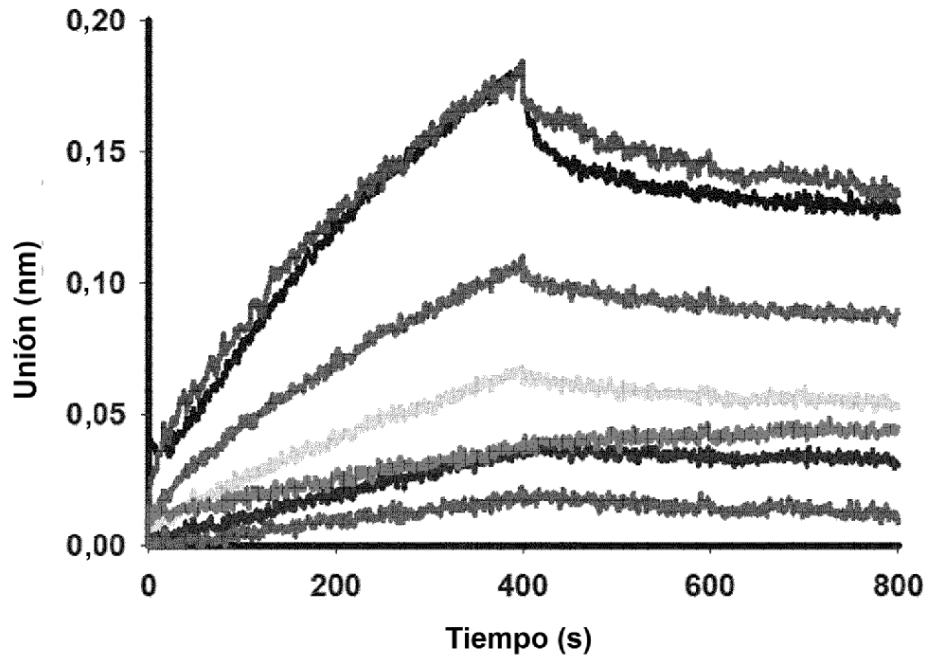
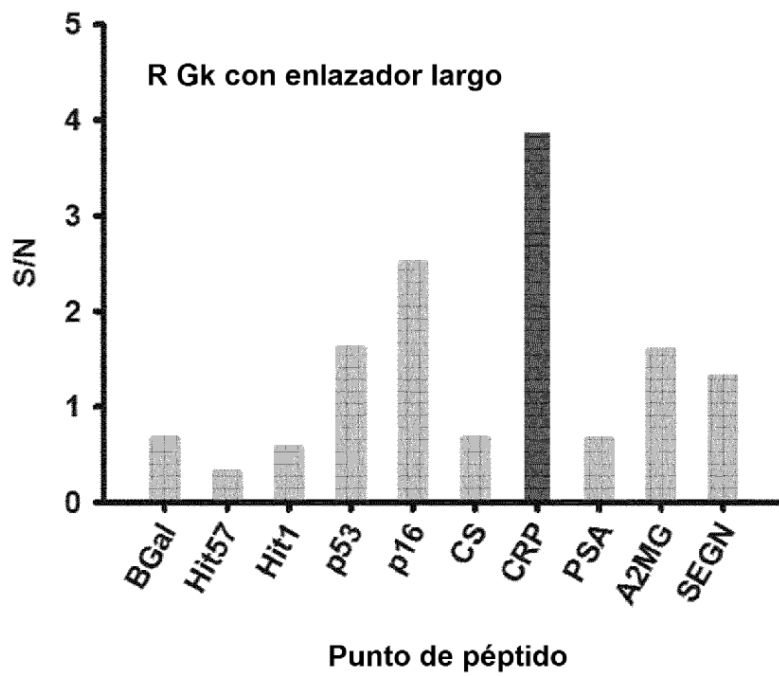


Figura 65



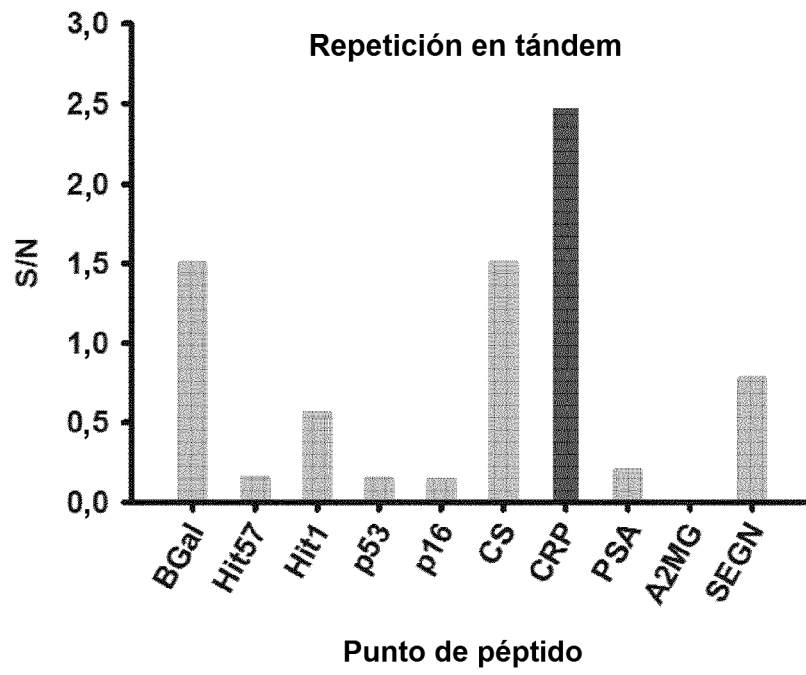
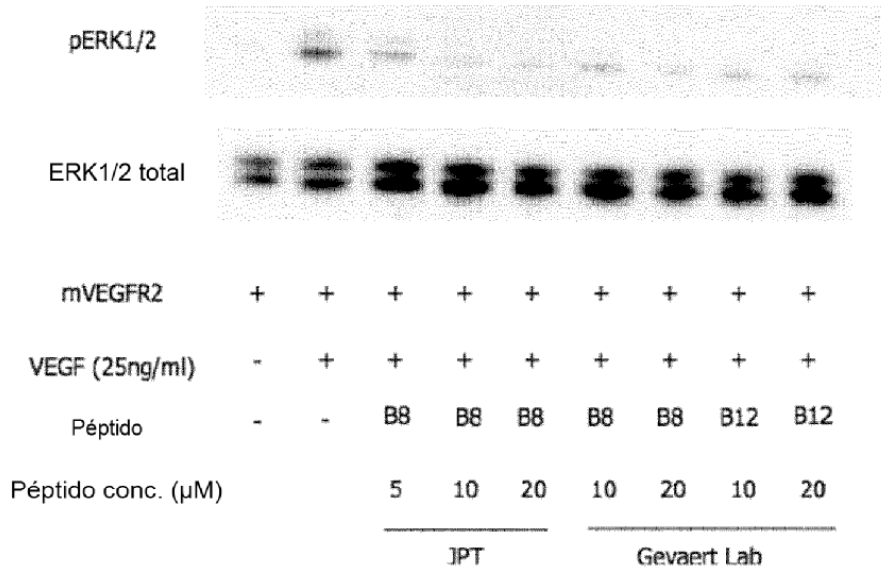


Figura 66

A

**Direccionamiento a VEGFR2 con péptidos – Exp 4
(Péptidos de diferentes fuentes)**



B

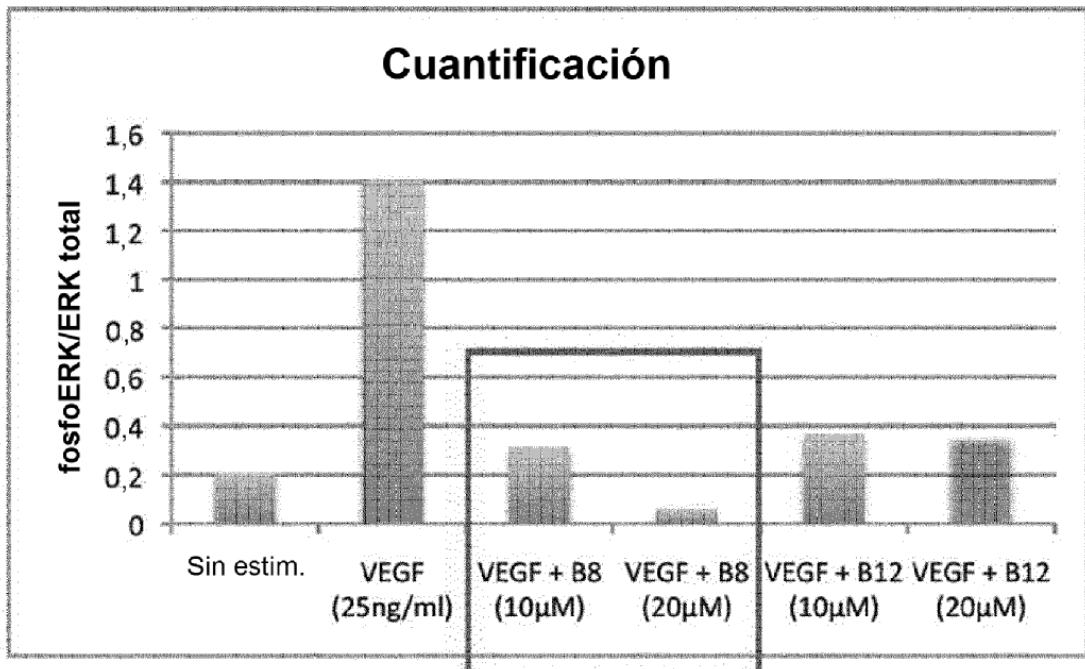


Figura 67

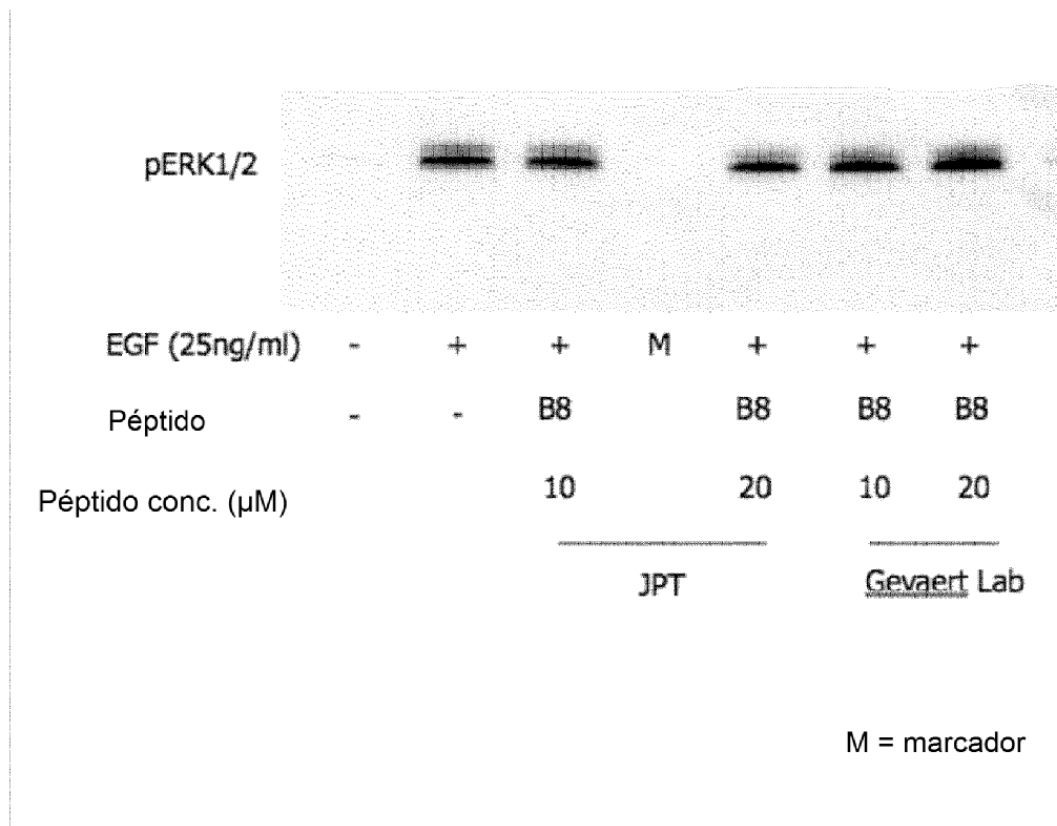


Figura 68

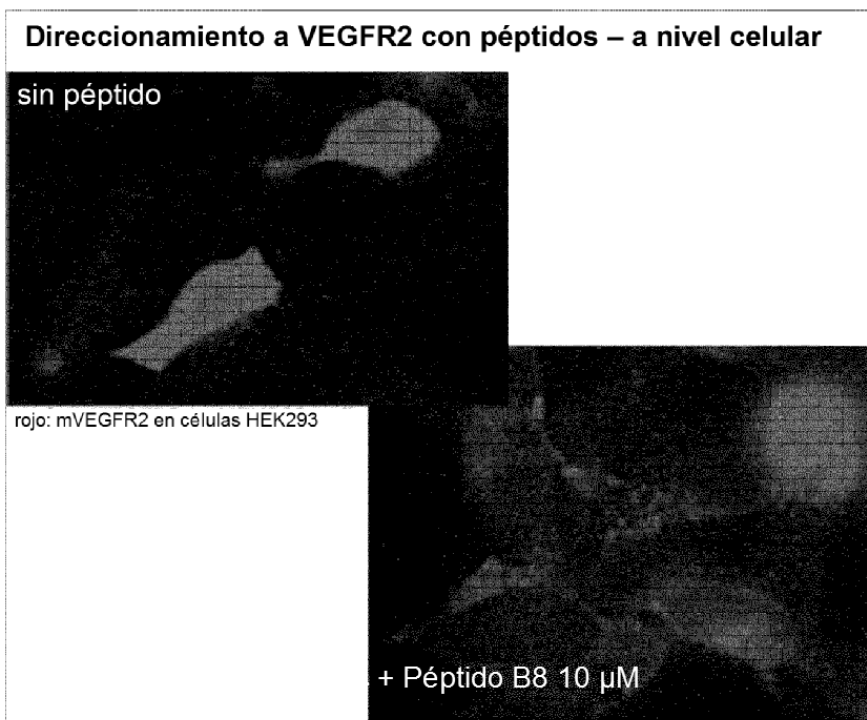


Figura 69

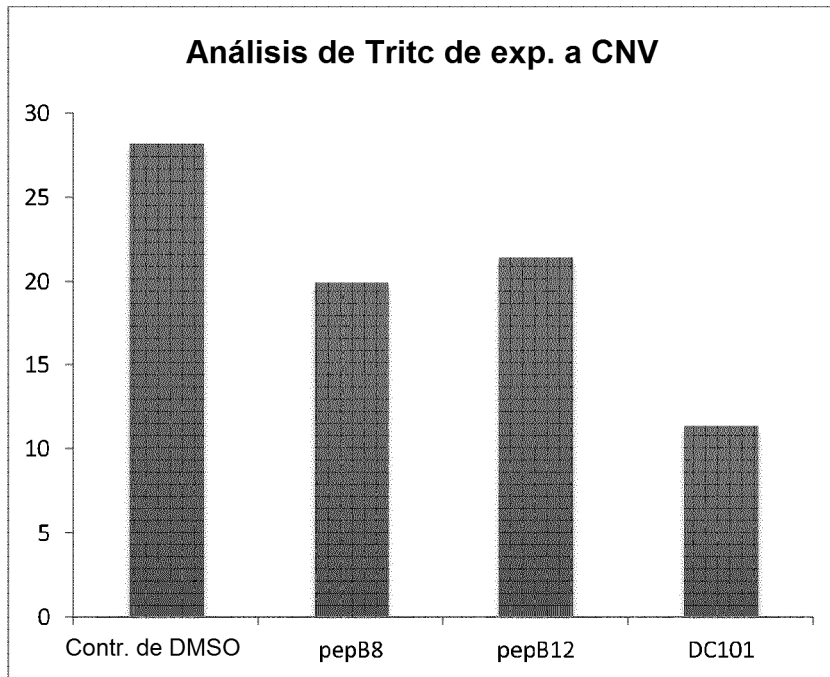


Figura 71

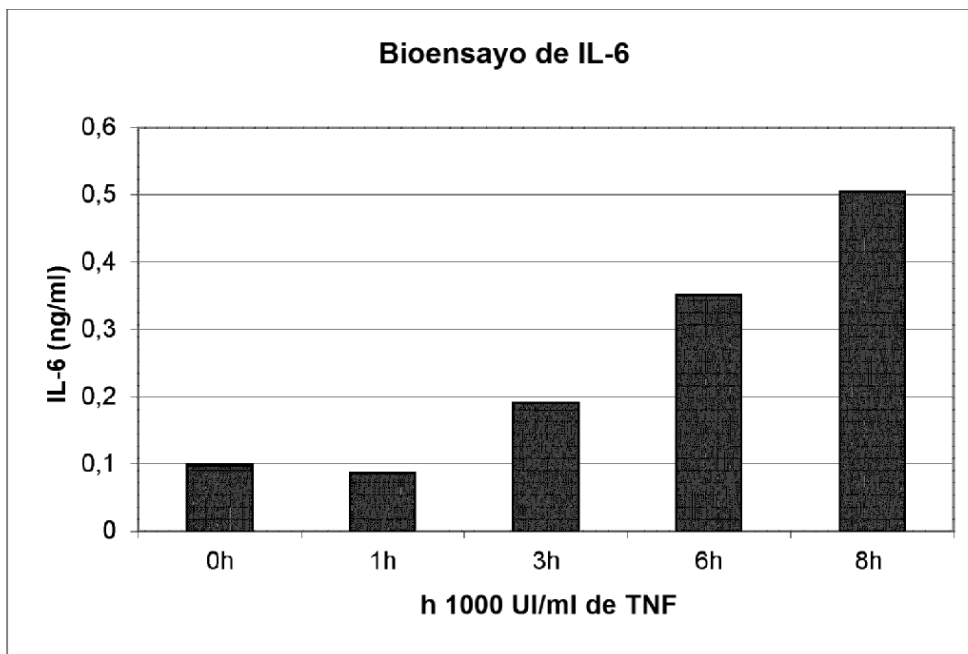
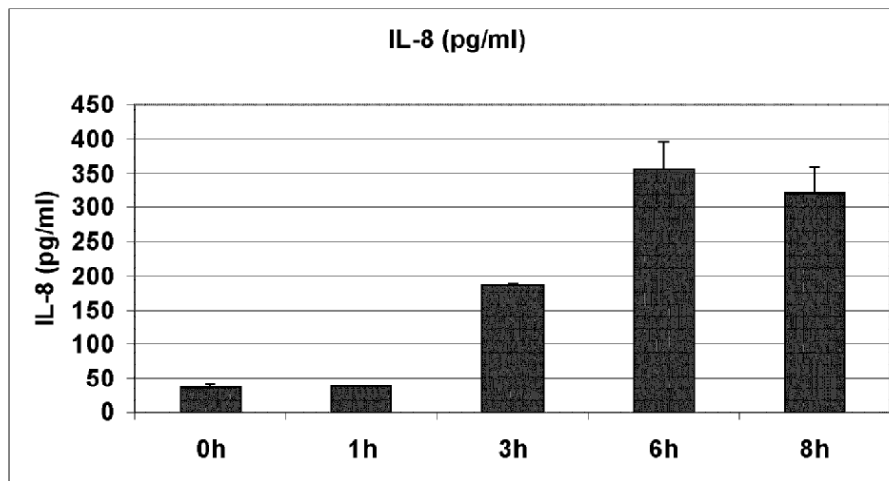
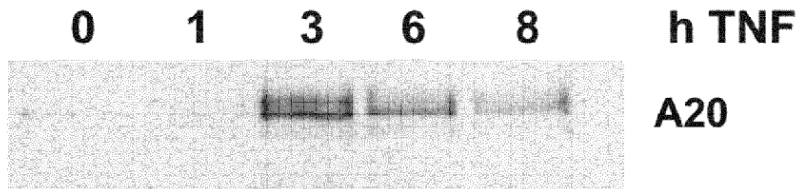


Figura 72

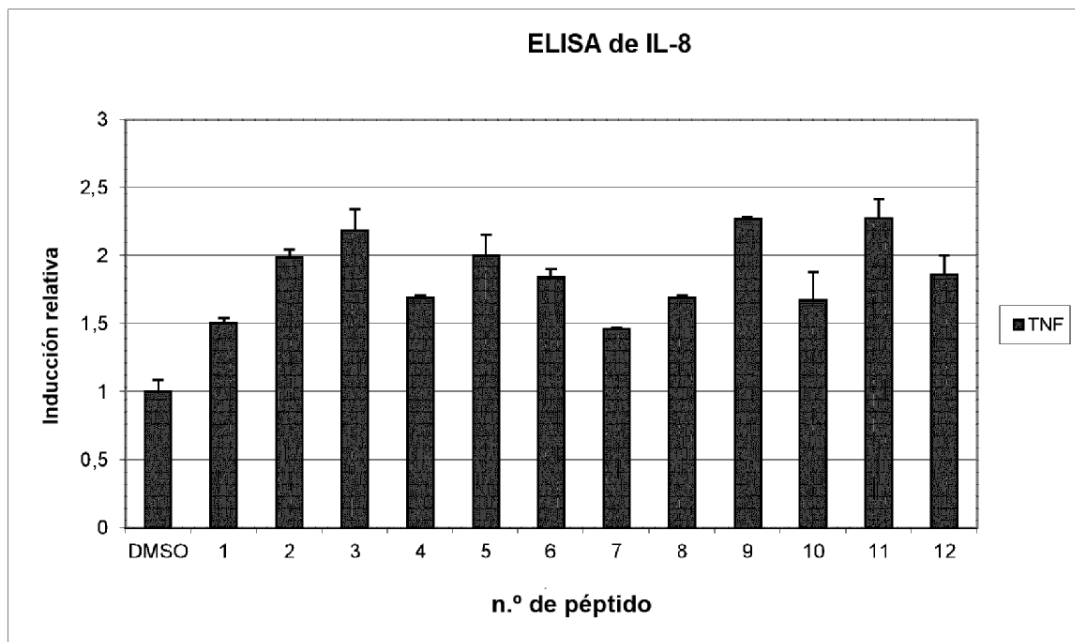
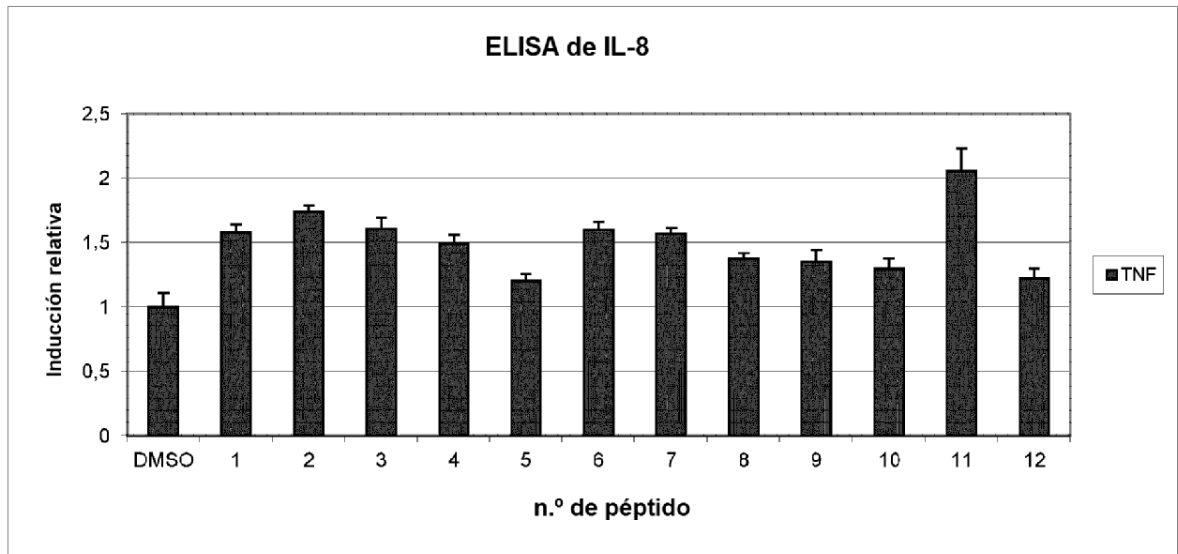


Figura 73

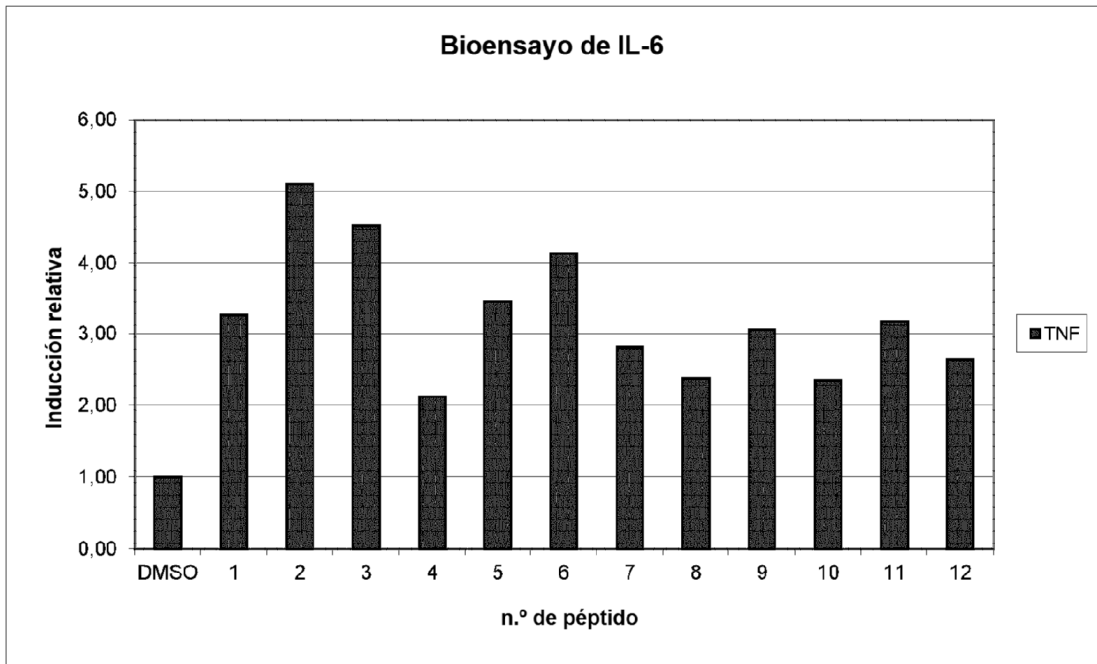
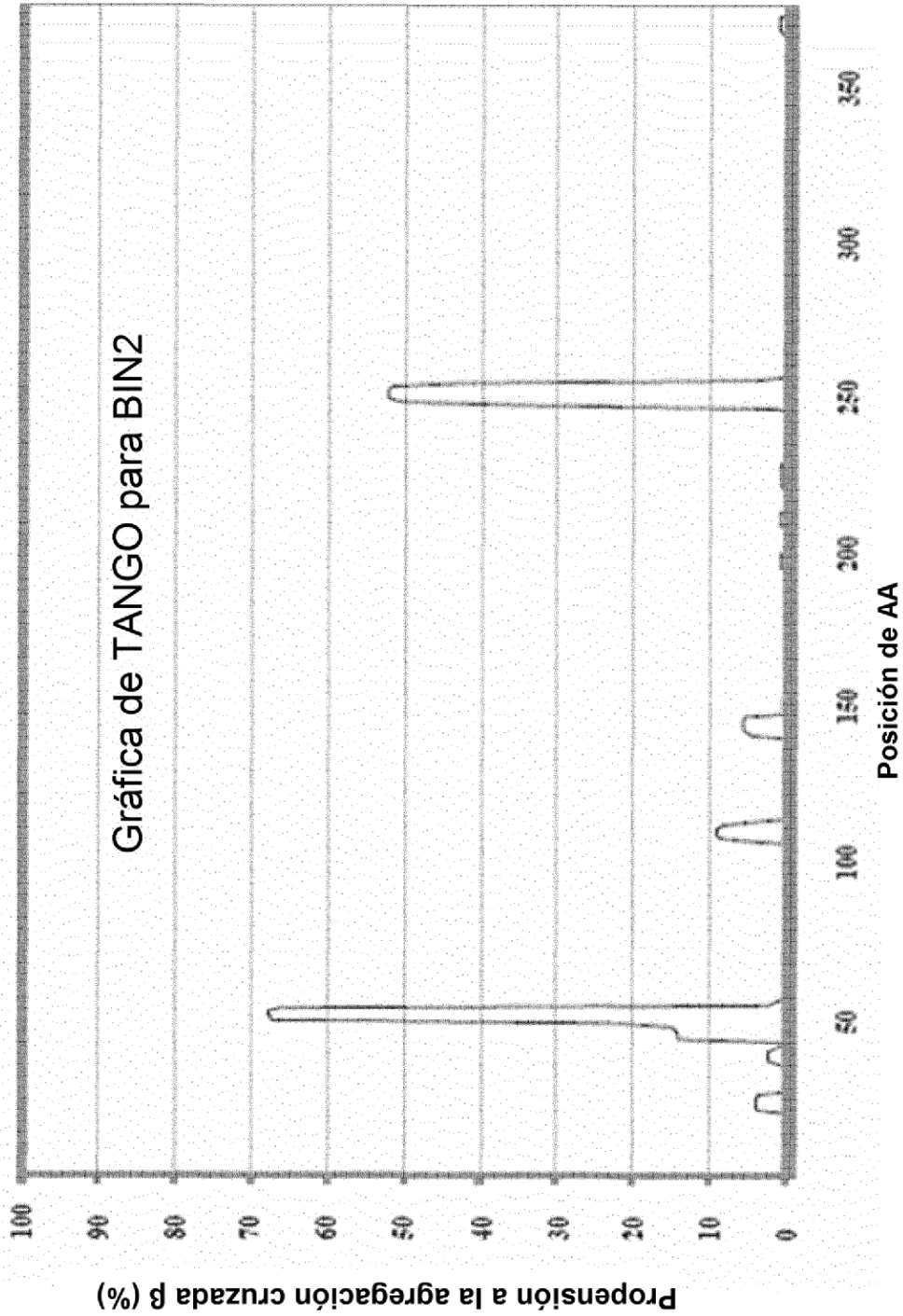


Figura 74

A



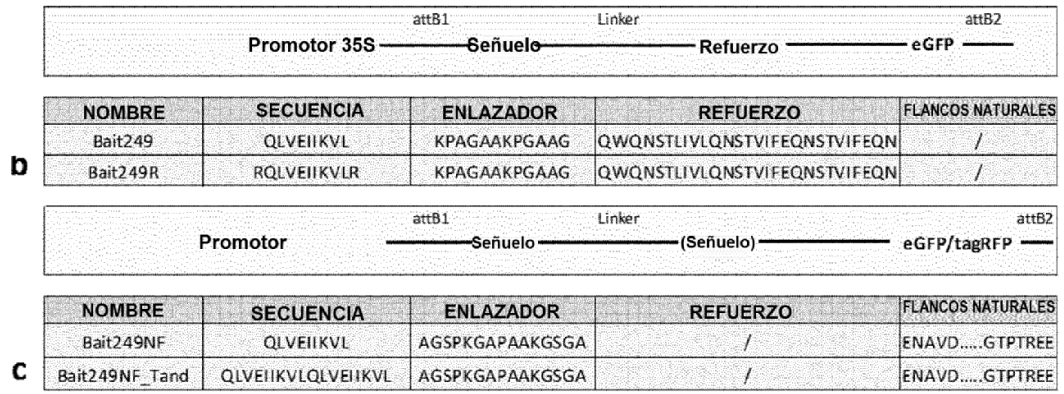


Figura 75

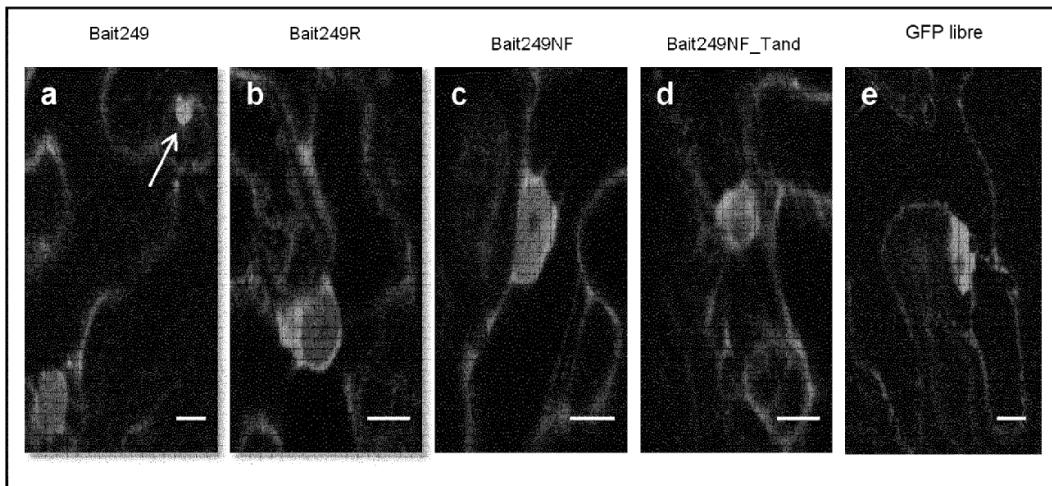


Figura 76

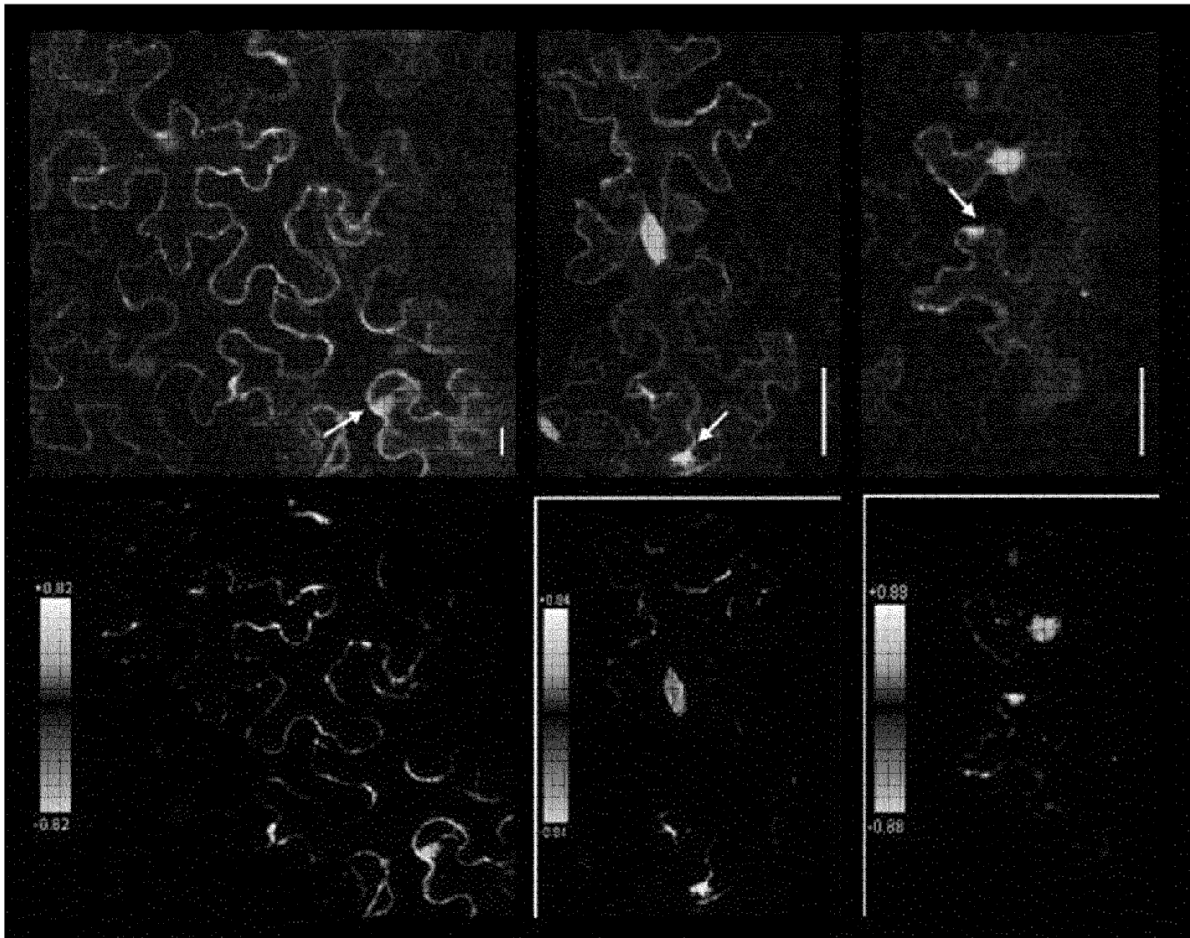


Figura 77

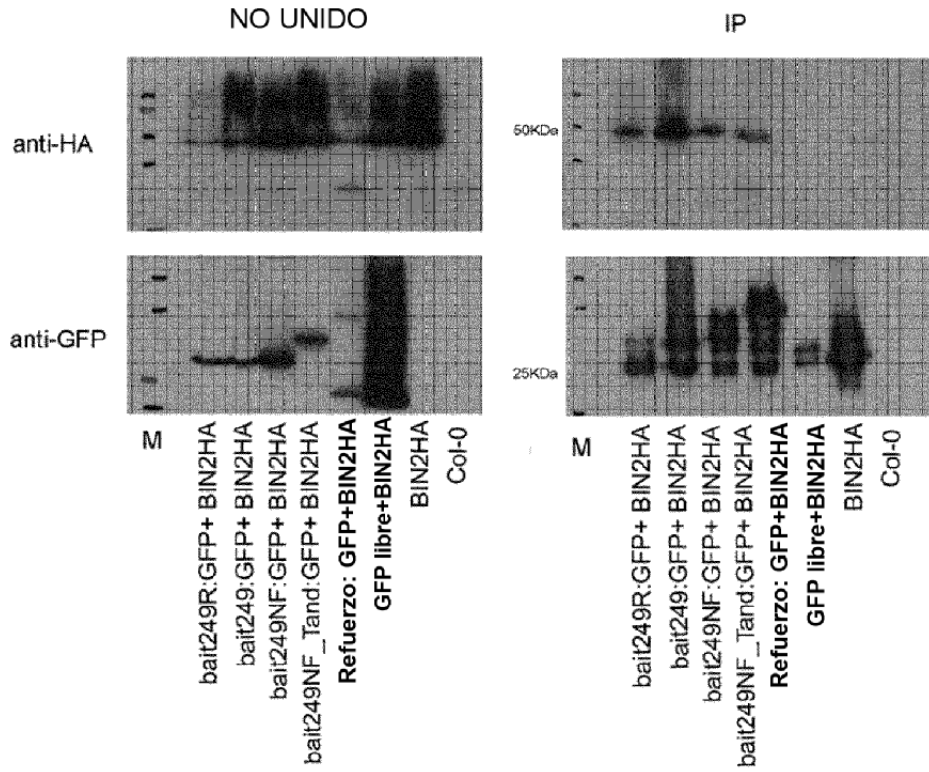


Figura 78

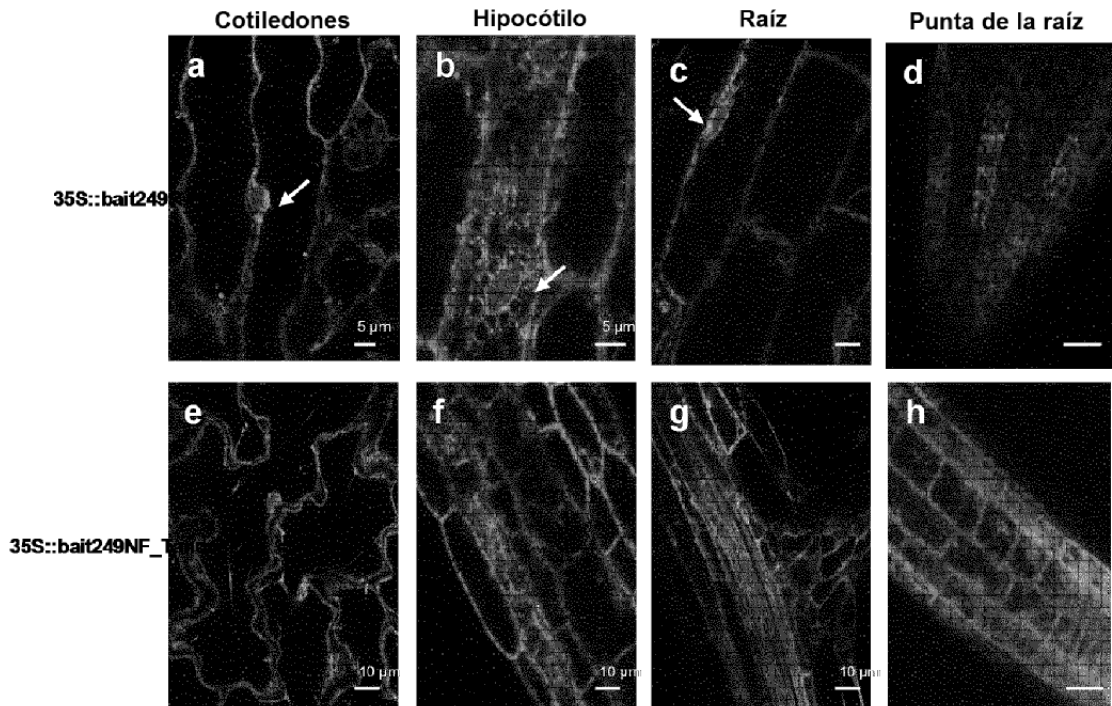


Figura 79

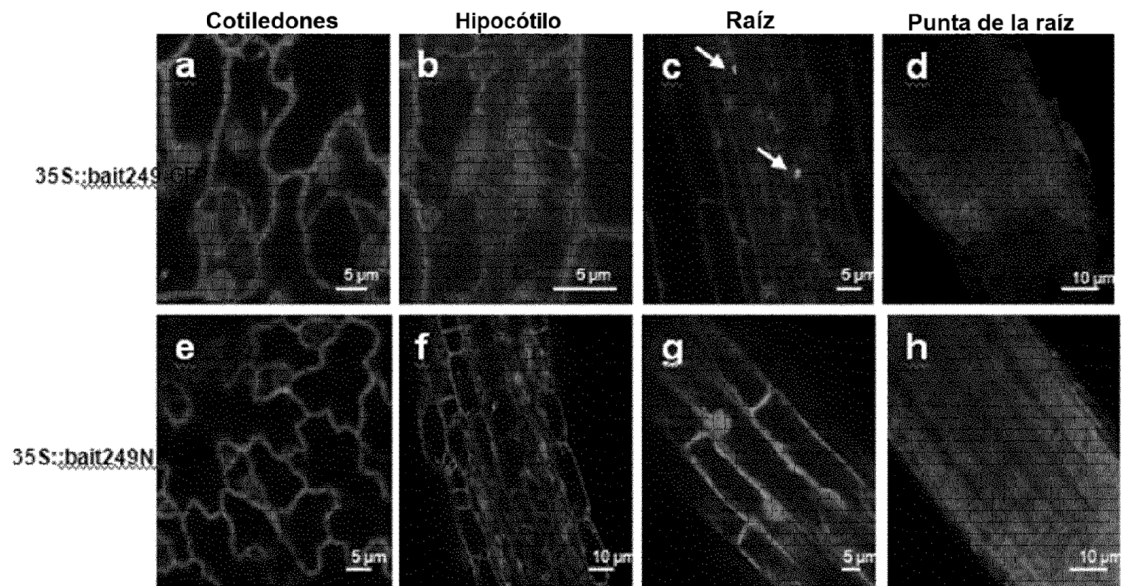


Figura 80

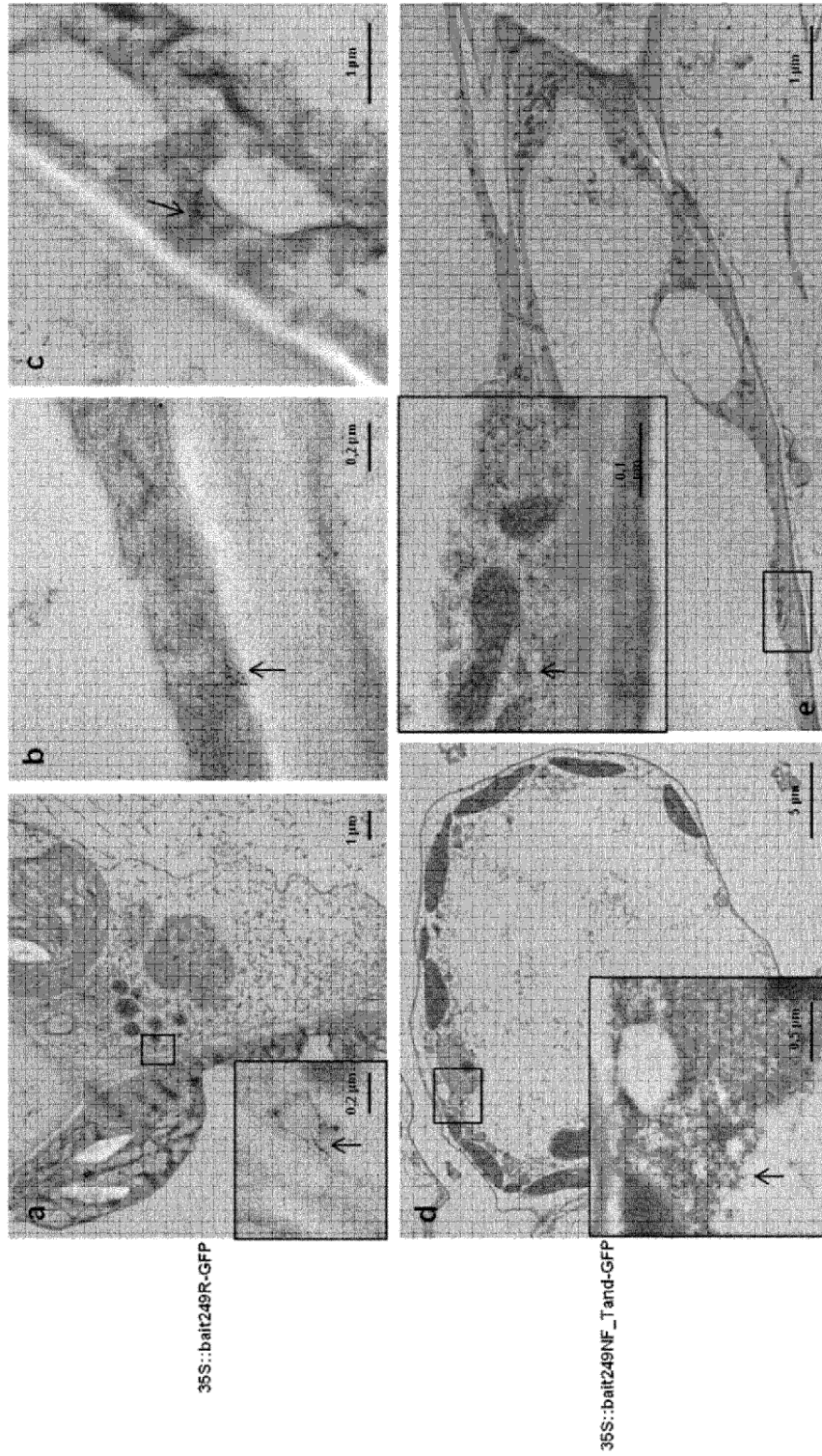
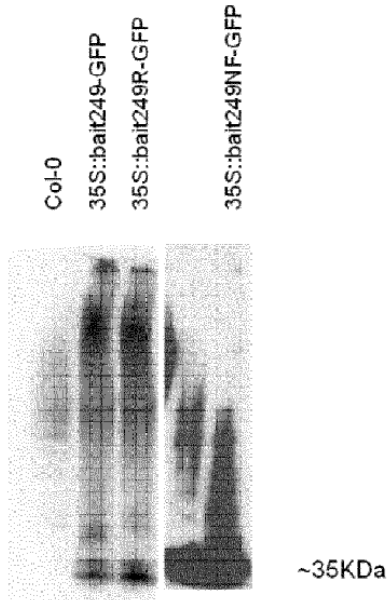
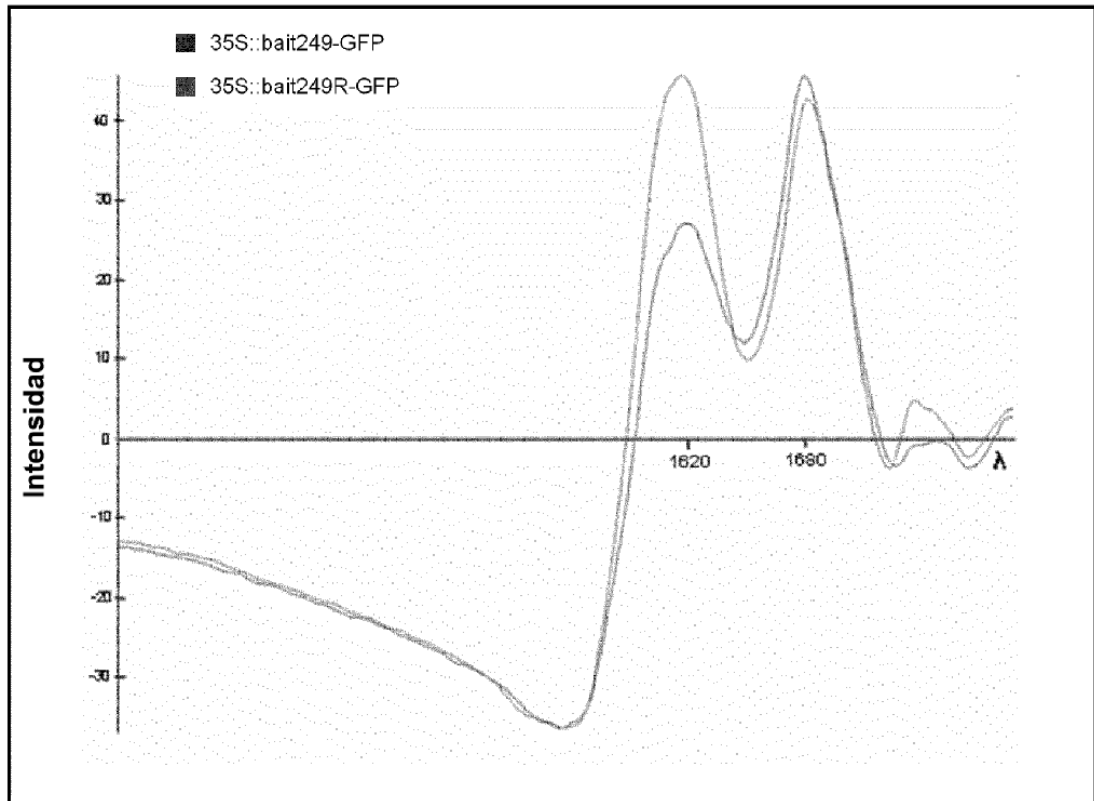


Figura 81

A



B



C

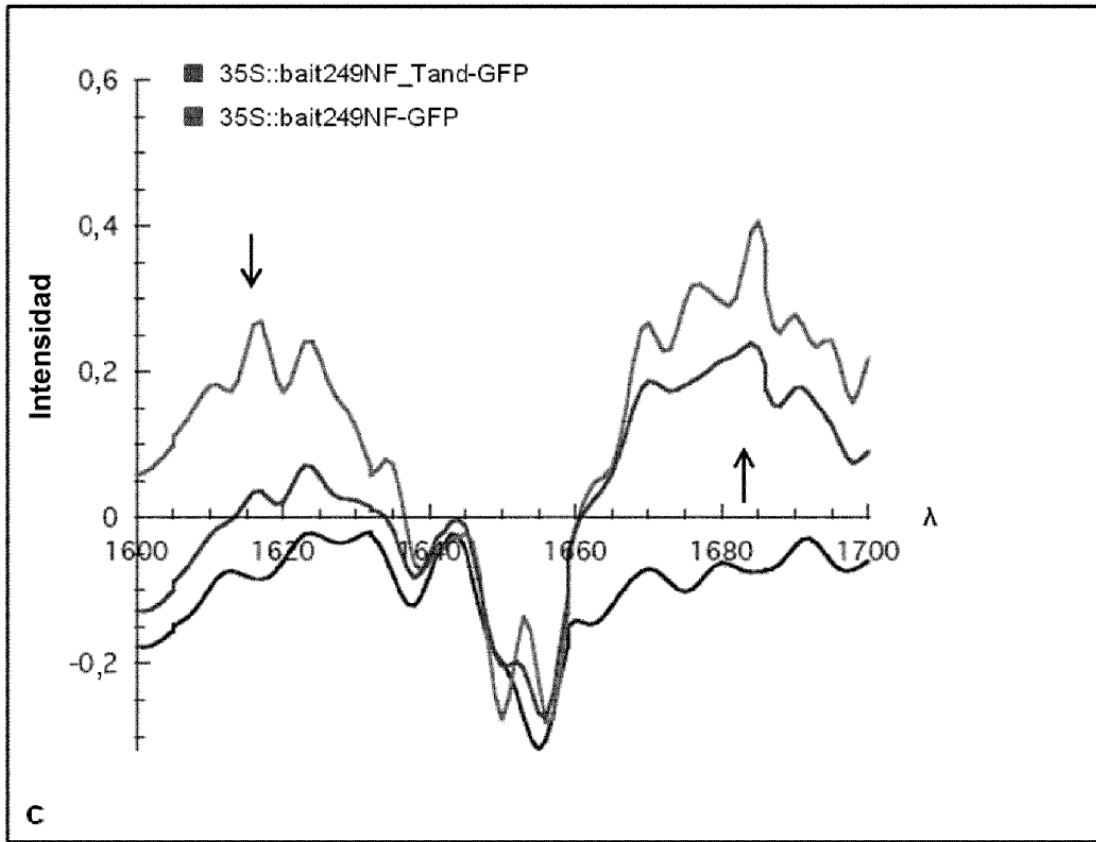
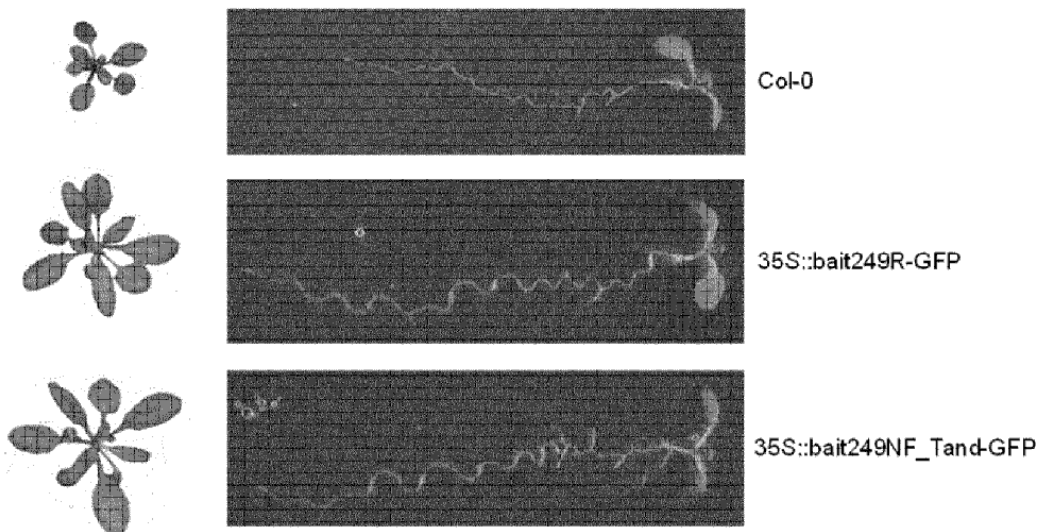
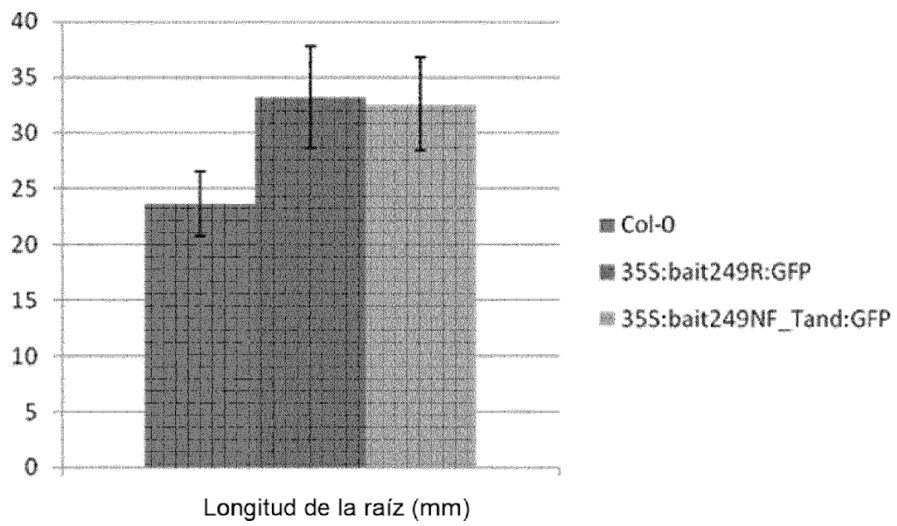
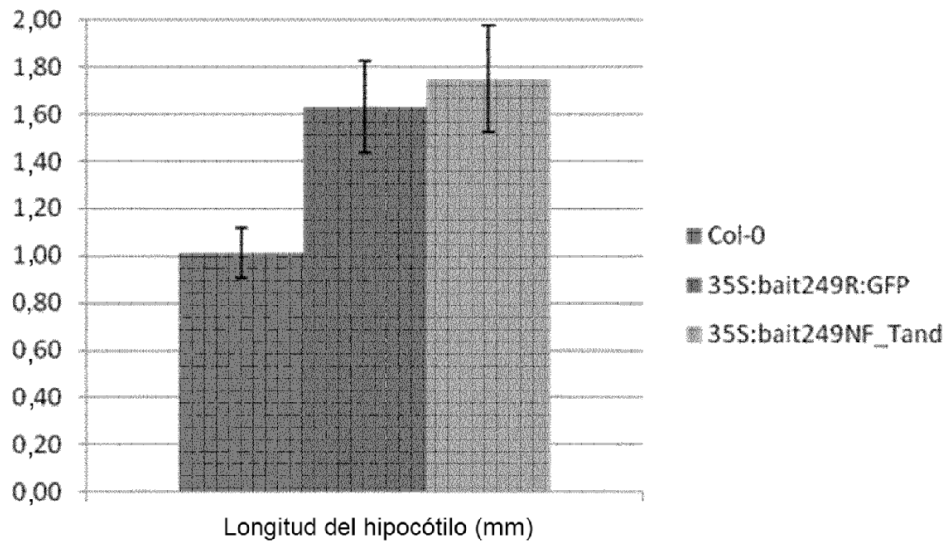


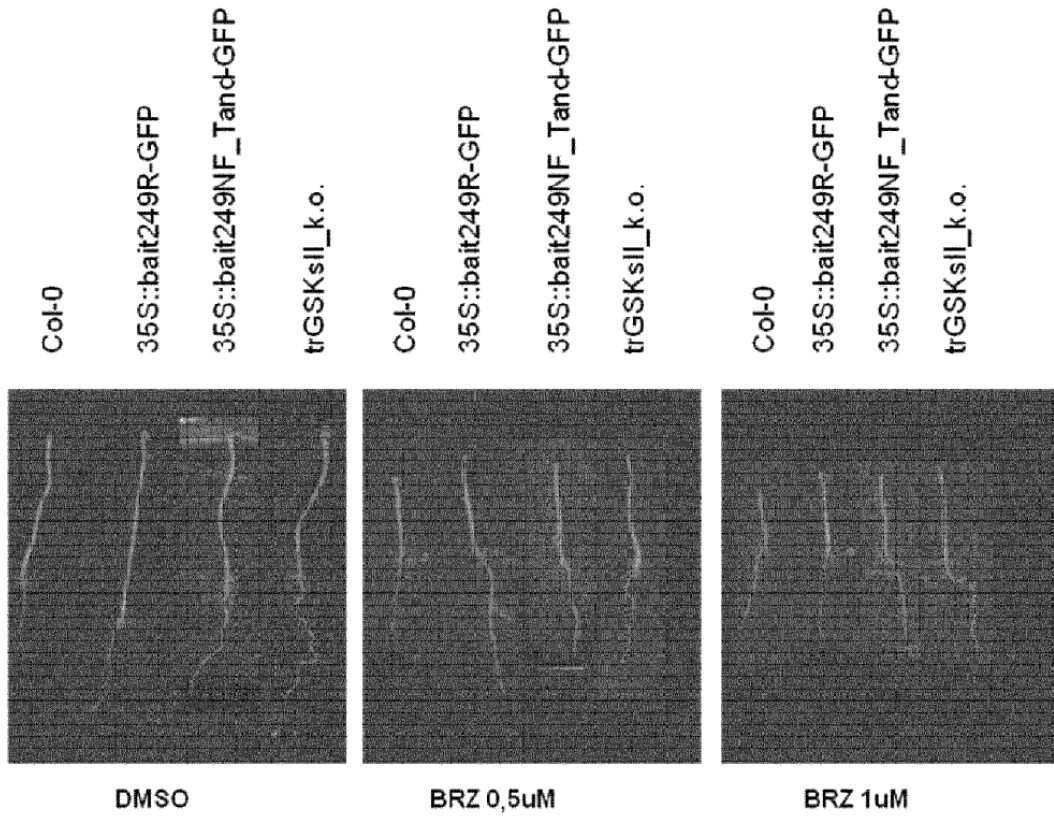
Figura 82

A





B



Respuesta a la dosis de BRZ

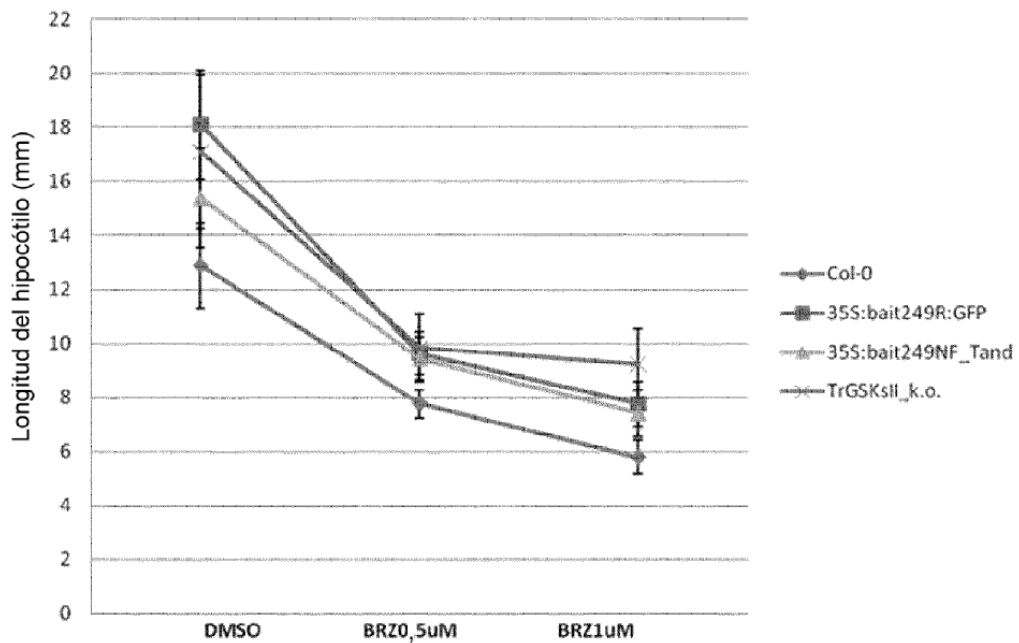
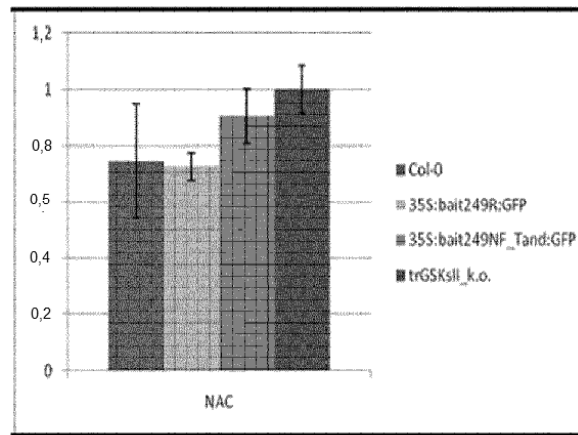
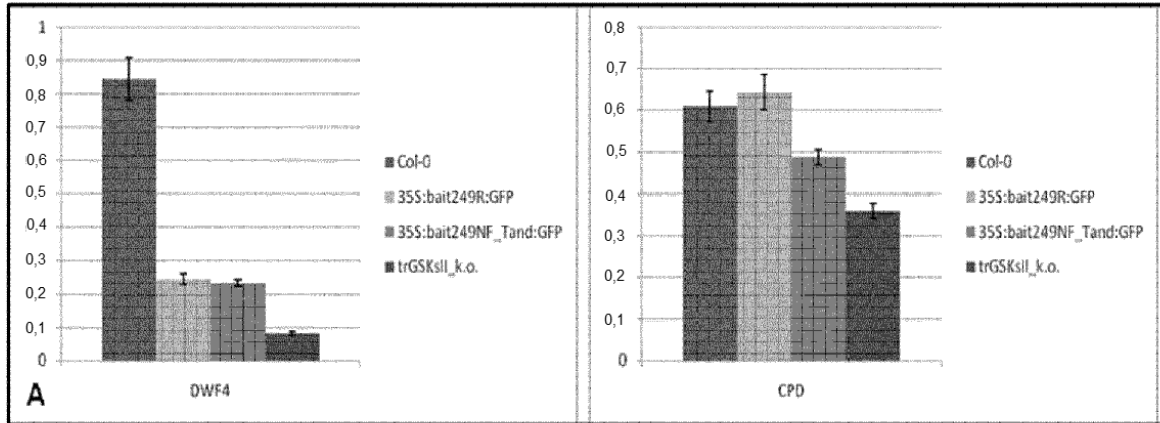
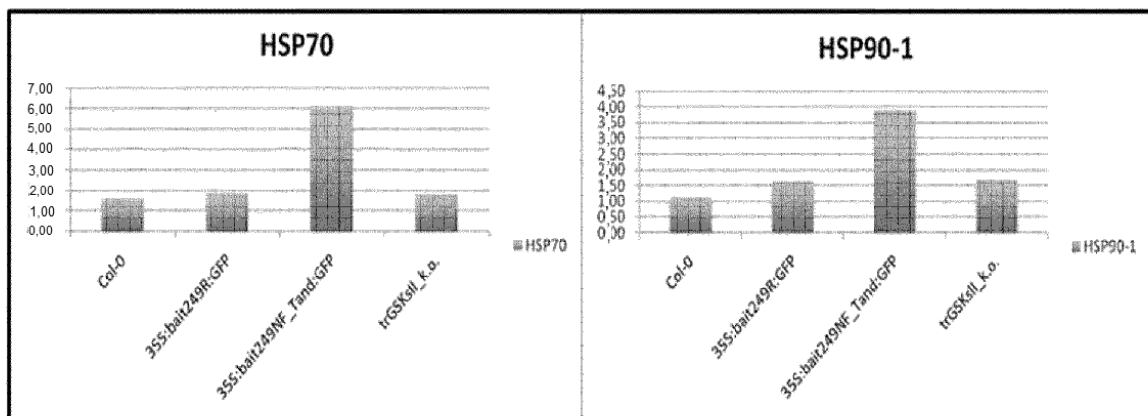


Figura 83

A



B



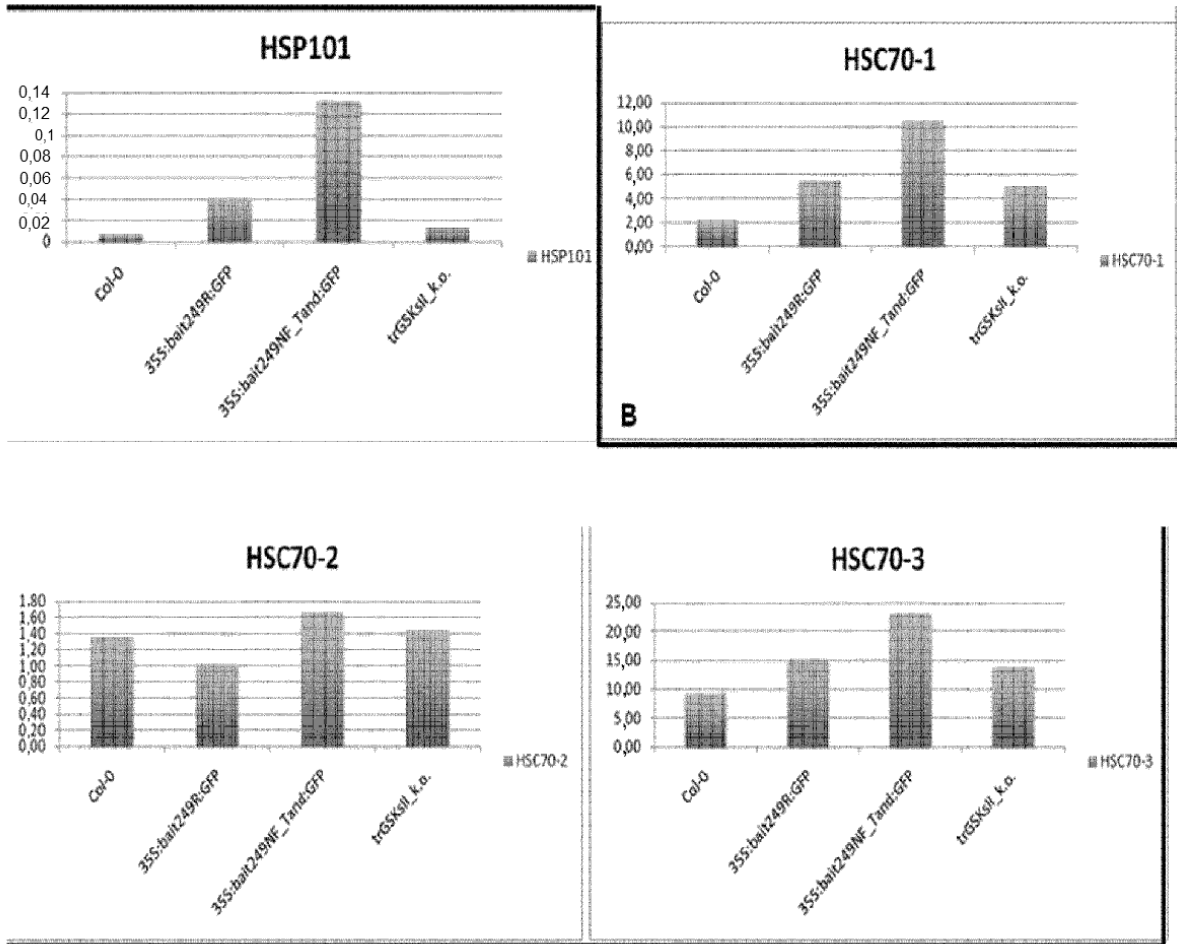


Figura 84

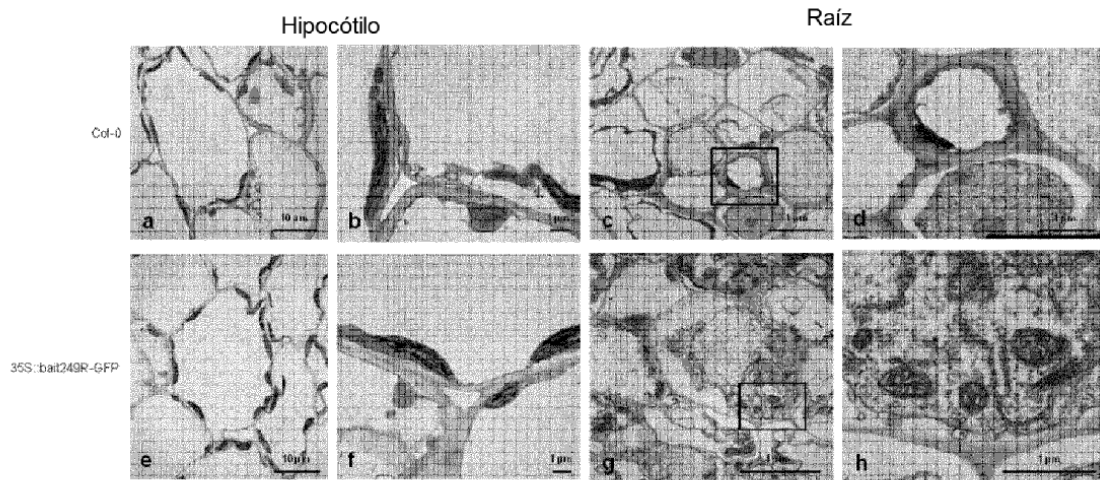


Figura 85

