

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 685 505**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2009 PCT/US2009/067378**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10068692**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 09832490 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2378875**

(54) Título: **Inhibidor de cinasas basado en péptidos de permeación celular**

(30) Prioridad:

10.12.2008 US 121396 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2018

(73) Titular/es:

PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
1281 Win Hentschel Boulevard
West Lafayette, IN 47906, US

(72) Inventor/es:

**PANITCH, ALYSSA y
SEAL, BRANDON**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 505 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

Inhibidor de cinasas basado en péptidos de permeación celular

Declaración de financiación gubernamental

5 La invención descrita se realizó con apoyo del gobierno en virtud de la subvención K25HL074968 otorgada por los National Institutes of Health. El gobierno tiene algunos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

La invención descrita se refiere a biología celular, péptidos de permeación celular, composiciones de péptidos de permeación celular y métodos de uso de los mismos, así como métodos de diseño de proteínas.

Antecedentes

10 La conformación tridimensional de una molécula de proteínas está determinada por su secuencia de aminoácidos, y los detalles de la conformación de una proteína determinan su química.

15 Una proteína consiste generalmente en una cadena principal de polipéptido con cadenas laterales unidas. La secuencia de las cadenas laterales químicamente diferentes del aminoácido hace que cada proteína sea distinta. La estructura plegada de una proteína se estabiliza mediante interacciones no covalentes (p. ej., enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y atracciones de van der Waals) que se forman entre partes diferentes de la cadena de polipéptidos, una parte de la cadena y otra. La estabilidad de cada forma plegada está determinada por la fuerza combinada de un gran número de estos enlaces no covalentes.

20 Cada proteína tiene cuatro niveles de organización estructural. La secuencia de aminoácidos es la estructura primaria de la proteína. La estructura secundaria está definida por patrones de enlaces de hidrógeno entre la amida de la cadena principal y los grupos carboxilo sin la consideración de enlaces de hidrógeno entre cadena lateral y cadena principal y entre cadena lateral y cadena lateral (p. ej., hélice α , hoja β). La estructura terciaria, la organización tridimensional completa de una cadena de polipéptidos, es la forma en que las hojas y hélices de la estructura secundaria de una proteína se pliegan sobre sí mismas para definir la estructura tridimensional. La estructura cuaternaria se refiere a la estructura completa de una molécula de proteína formada como un complejo de más de una cadena de polipéptidos,

25 Los dominios de proteínas son unidades estructurales que se pliegan más o menos independientemente entre sí para formar estructuras compactas globulares. Un dominio contiene habitualmente entre aproximadamente 40 y aproximadamente 350 aminoácidos, y es la unidad modular a partir de la cual se construyen muchas proteínas de mayor tamaño. Los diferentes dominios de una proteína se asocian a menudo con funciones diferentes. La estructura plegada final, o conformación, adoptada por cualquier cadena de polipéptidos es generalmente aquella para la que la energía libre se reduce al mínimo.

1. Cinasas

30 Cinasas son un grupo ubicuo de enzimas que catalizan la reacción de transferencia de fosforilo desde un donador de fosfatos (normalmente adenosina-5'-trifosfato (ATP)) a un sustrato receptor. Aunque todas las cinasas catalizan esencialmente la misma reacción de transferencia de fosforilo, muestran una notable diversidad en su especificidad de sustrato, su estructura y las vías en las que participan. Una reciente clasificación de todas las secuencias de cinasas disponibles (aproximadamente 60.000 secuencias) indica que las cinasas pueden agruparse en 25 familias de proteínas homólogas. Estas familias de cinasas se reúnen además en 12 grupos de plegamiento basados en la similitud del plegamiento estructural. Además, 22 de las 25 familias (aproximadamente el 98,8 % de todas las secuencias) pertenecen a 10 grupos de plegamiento para los cuales se conoce el plegamiento estructural. De las otras 3 familias, la cinasa polifosfato forma un grupo de plegamiento distinto, y las 2 familias restantes son cinasas de membrana integral y comprenden el grupo de plegamiento final. Estos grupos de plegamiento no sólo incluyen algunos de los plegamientos de proteínas más extendidos, como el plegamiento de tipo Rossmann (tres o más cadenas beta paralelas unidas por dos hélices alfa en el orden topológico beta-alfa-beta-alfa-beta), el plegamiento de tipo ferredoxina (un plegamiento común de proteínas $\alpha+\beta$ con una estructura secundaria $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ distintiva a lo largo de su cadena principal), el plegamiento en barril TIM (que significa un plegamiento de proteínas conservado que consiste en ocho hélices α y ocho cadenas β paralelas que se alternan a lo largo de la cadena principal peptídica) y plegamiento en barril β antiparalelo (un barril beta es una gran hoja beta que se retuerce y se enrolla para formar una estructura cerrada en la que la primera cadena es hidrógeno unido a la última), sino también todas las clases principales (todas las α , todas las β , $\alpha+\beta$, α/β) de estructuras de proteínas. Dentro de un grupo de plegamiento, el núcleo del dominio de unión a nucleótidos de cada familia tiene la misma arquitectura, y la topología del núcleo de proteínas es idéntica o está relacionada por permutación circular. La homología entre las familias dentro de un grupo de plegamiento no está implícita.

55 Las cinasas del Grupo I (23.124 secuencias) incluyen proteína S/T-Y cinasa, proteína-cinasa atípica, cinasa lipídica y enzimas de captación de ATP y comprenden además la proteína S/T-Y cinasa, y la familia de proteínas cinasas

5 atípicas (22,074 secuencias). Estas cinasas incluyen: colina-cinasa (EC 2.7.1.32); proteína-cinasa (EC 2.7.1.37); fosforilasa-cinasa (EC 2.7.1.38); homoserina-cinasa (EC 2.7.1.39); 1-fosfatidilinositol-4-cinasa (EC 2.7.1.67); estreptomicina 6-cinasa (EC 2.7.1.72); etanolamina-cinasa (EC 2.7.1.82); estreptomicina-3'-cinasa (EC 2.7.1.87); kanamicina-cinasa (EC 2.7.1.95); 5-metiltiioribosa-cinasa (EC 2.7.1.100); viomicina-cinasa (EC 2.7.1.103); [hidroximetilglutaril-CoA reductasa (NADPH₂)] cinasa (EC 2.7.1.109); proteína-tirosina-cinasa (EC 2.7.1.112); [isocitrato deshidrogenasa (NADP⁺)] cinasa (EC 2.7.1.116); [cadena ligera de miosina] cinasa (EC 2.7.1.117); 10 higromicina-B cinasa (EC 2.7.1.119); proteína-cinasa dependiente de calcio/calmodulina (EC 2.7.1.123); rodopsina-cinasa (EC 2.7.1.125); [receptor beta adrenérgico] cinasa (EC 2.7.1.126); [cadena pesada de miosina] cinasa (EC 2.7.1.129); 15 [proteína Tau] cinasa (EC 2.7.1.135); macrólido 2'-cinasa (EC 2.7.1.136); I-fosfatidilinositol 3-cinasa (EC 2.7.1.137); cinasa de subunidad de [ARN polimerasa] (EC 2.7.1.141); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa (EC 2.7.1.153); y fosfatidilinositol-4-fosfato 3-cinasa (EC 2.7.1.154). El Grupo I comprende además la familia de cinasas lipídicas (321 secuencias). Estas cinasas incluyen: I-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-cinasa (EC 2.7.1.68); I-D-mioinositol-trifosfato 3-cinasa (EC 2.7.1.127); inositol-tetraquisfosfato-5-cinasa (EC 2.7.1.140); 1-fosfatidilinositol-5-fosfato-4-cinasa (EC 2.7.1.149); 1-fosfatidilinositol-3-fosfato-5-cinasa (EC 2.7.1.150); inositol-polifosfato-multicinasa (EC 2.7.1.151); e inositol-hexaquisfosfato-cinasa (EC 2.7.4.21). El Grupo I comprende además las cinasas de captación de ATP (729 secuencias) que incluyen inositol-tetraquisfosfato-1-cinasa (EC 2.7.1.134); piruvato, fosfato-dicinasa (EC 2.7.9.1); y piruvato, agua dicinasa (EC 2.7.9.2).

20 Las cinasas del Grupo II (17.071 secuencias) incluyen las cinasas de tipo Rossman. El Grupo II comprende la familia de cinasas en bucle P (7.732 secuencias). Incluyen gluconocinasa (EC 2.7.1.12); fosforribulocinasa (EC 2.7.1.19); 25 timidina-cinasa (EC 2.7.1.21); ribosilnicotinamida cinasa (EC 2.7.1.22); defosfo-CoA cinasa (EC 2.7.1.24); adenililsulfato-cinasa (EC 2.7.1.25); pantotenato-cinasa (EC 2.7.1.33); proteína-cinasa (bacteriana) (EC 2.7.1.37); uridina-cinasa (EC 2.7.1.48); shikimato-cinasa (EC 2.7.1.71); desoxicitidina-cinasa (EC 2.7.1.74); desoxiadenosina-cinasa (EC 2.7.1.76); polinucleótido 5'-hidroxil-cinasa (EC 2.7.1.78); 6-fosfofructo-2-cinasa (EC 2.7.1.105); desoxiguanosina-cinasa (EC 2.7.1.113); tetraacildisacárido 4'-cinasa (EC 2.7.1.130); desoxinucleósido cinasa (EC 2.7.1.145); 30 adenosilcobinamida cinasa (EC 2.7.1.156); polifosfato-cinasa (EC 2.7.4.1); fosfomevalonato-cinasa (EC 2.7.4.2); adenilato-cinasa (EC 2.7.4.3); nucleósido-fosfato-cinasa (EC 2.7.4.4); guanilato-cinasa (EC 2.7.4.8); timidilato-cinasa (EC 2.7.4.9); nucleósido-trifosfato-adenilato-cinasa (EC 2.7.4.10); (desoxi)nucleósido-fosfato-cinasa (EC 2.7.4.13); citidilato-cinasa (EC 2.7.4.14); y uridilato-cinasa (EC 2.7.4.-). El Grupo II comprende además la familia 35 de las fosfoenolpiruvato carboxicinasas (815 secuencias). Estas enzimas incluyen proteína-cinasa (HPr cinasa/fosfatasa) (EC 2.7.1.37); fosfoenolpiruvato carboxicinasa (GTP) (EC 4.1.1.32); y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (ATP) (EC 4.1.1.49). El Grupo II comprende además la familia de las fosfoglicerato-cinasas (1.351 secuencias). Estas enzimas incluyen fosfoglicerato-cinasa (EC 2.7.2.3) y fosfoglicerato-cinasa (GTP) (EC 2.7.2.10). 40 El Grupo II comprende además la familia de las aspartocinasas (2.171 secuencias). Estas enzimas incluyen carbamato-cinasa (EC 2.7.2.2); aspartato-cinasa (EC 2.7.2.4); acetilglutamato-cinasa (EC 2.7.2.8 1); glutamato 5-cinasa (EC 2.7.2.1) y uridilato-cinasa (EC 2.7.4.-). El Grupo II comprende además la familias de cinasas de tipo 45 fosfofructocinasa (1.998 secuencias). Estas enzimas incluyen 6-fosfofrutocinasa (EC 2.7.1.11); NAD(+) cinasa (EC 2.7.1.23); I-fosfofructocinasa (EC 2.7.1.56); difosfato-fructosa-6-fosfato I-fosfotransferasa (EC 2.7.1.90); esfinganina-cinasa (EC 2.7.1.91); diacilglicerol cinasa (EC 2.7.1.107); y ceramida cinasa (EC 2.7.1.138). El Grupo II comprende además la familia de tipo ribocinasas (2.722 secuencias). Estas enzimas incluyen: glucocinasa (EC 2.7.1.2); 50 cetohexocinasa (EC 2.7.1.3); fructocinasa (EC 2.7.1.4); 6-fosfofructocinasa (EC 2.7.1.11); ribocinasa (EC 2.7.1.15); adenosina-cinasa (EC 2.7.1.20); piridoxal-cinasa (EC 2.7.1.35); 2-deshidro-3-desoxigluconocinasa (EC 2.7.1.45); hidroximetilpirimidina-cinasa (EC 2.7.1.49); hidroxietiltiazol-cinasa (EC 2.7.1.50); I-fosfofructocinasa (EC 2.7.1.56); 55 inosina-cinasa (EC 2.7.1.73); 5-deshidro-2-desoxigluconocinasa (EC 2.7.1.92); tagatosa-6-fosfato-cinasa (EC 2.7.1.144); fosfofructocinasa dependiente de ADP (EC 2.7.1.146); glucocinasa dependiente de ADP (EC 2.7.1.147); y fosfometilpirimidina-cinasa (EC 2.7.4.7). El Grupo II comprende además la familia de las tiamina-pirofosfocinasas (175 secuencias) que incluye la tiamina-pirofosfocinasa (EC 2.7.6.2). El Grupo II comprende además la familia de las 60 glicerato-cinasas (107 secuencias) que incluye la glicerato-cinasa (EC 2.7.1.31).

Las cinasas del Grupo III (10.973 secuencias) comprenden las cinasas de plegamiento de tipo ferredoxina. El Grupo III comprende además la familia de las nucleósido-difosfato-cinasas (923 secuencias). Estas enzimas incluyen la nucleósido-difosfato-cinasa (EC 2.7.4.6). El Grupo III comprende además la familia de las HPPK cinasas (609 secuencias). Estas enzimas incluyen la 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina pirofosfocinasa (EC 2.7.6.3). Grupo III comprende además la familia de las guanido-cinasas (324 secuencias). Estas enzimas incluyen guanidoacetato-cinasa (EC 2.7.3.1); creatina-cinasa (EC 2.7.3.2); arginina-cinasa (EC 2.7.3.3); y lombricina-cinasa (EC 2.7.3.5). El Grupo III comprende además la familia de las histidina-cinasas (9.117 secuencias). Estas enzimas incluyen proteína-cinasa (histidina-cinasa) (EC 2.7.1.37); [piruvato deshidrogenasa (lipoamida)] cinasa (EC 2.7.1.99); y [3-metil-2-oxibutanoato deshidrogenasa(lipoamida)] cinasa (EC 2.7.1.115).

60 Las cinasas del Grupo IV (2.768 secuencias) incluyen las cinasas de tipo ribonucleasa H. Estas enzimas incluyen hexocinasa (EC 2.7.1.1); glucocinasa (EC 2.7.1.2); fructocinasa (EC 2.7.1.4); rhamnulocinasa (EC 2.7.1.5); manocinasa (EC 2.7.1.7); gluconocinasa (EC 2.7.1.12); L-ribulocinasa (EC 2.7.1.16); xilulocinasa (EC 2.7.1.17); eritritol cinasa (EC 2.7.1.27); glicerol cinasa (EC 2.7.1.30); pantotenato-cinasa (EC 2.7.1.33); D-ribulocinasa (EC 2.7.1.47); L-fucolocinasa (EC 2.7.1.51); L-xilulocinasa (EC 2.7.1.53); aloso-cinasa (EC 2.7.1.55); 2-deshidro-3-desoxigalactonocinasa (EC 2.7.1.58); N-acetilglucosamina-cinasa (EC 2.7.1.59); N-acilmanosaminocinasa (EC 2.7.1.60); polifosfato-glucosa fosfotransferasa (EC 2.7.1.63); beta-glucósido cinasa (EC 2.7.1.85); acetato-cinasa

(EC 2.7.2.1); butirato-cinasa (EC 2.7.2.7); cinasa de ácidos grasos de cadena ramificada (EC 2.7.2.14); y propionato-cinasa (EC 2.7.2.-).

Las cinasas del Grupo V (1.119 secuencias) incluyen cinasas en barril TIM β/α . Estas enzimas incluyen la piruvato-cinasa (EC 2.7.1.40).

5 Las cinasas del Grupo VI (885 secuencias) incluyen GHMP cinasas. Estas enzimas incluyen galactocinasa (EC 2.7.1.6); mevalonato-cinasa (EC 2.7.1.36); homoserina-cinasa (EC 2.7.1.39); L-arabinocinasa (EC 2.7.1.46); fuccocinasa (EC 2.7.1.52); shikimato-cinasa (EC 2.7.1.71); 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa (EC 2.7.1.148); y fosfomevalonato-cinasa (EC 2.7.4.2)

10 Las cinasas del Grupo VII (1.843 secuencias) incluyen las cinasas de tipo AIR sintetasa. Estas enzimas incluyen tiamina-fosfato-cinasa (EC 2.7.4.16) y seleniuro, agua dicinasa (EC 2.7.9.3).

Las cinasas del Grupo VIII (565 secuencias) incluyen riboflavina-cinasas (565 secuencias). Estas enzimas incluyen la riboflavina-cinasa (EC 2.7.1.26).

Las cinasas del Grupo IX (197 secuencias) incluyen las dihidroxiacetona-cinasas. Estas enzimas incluyen la glicerona-cinasa (EC 2.7.1.29).

15 Las cinasas del Grupo X (148 secuencias) incluyen las glicerato-cinasas. Estas enzimas incluyen la glicerato-cinasa (EC 2.7.1.31).

Las cinasas del Grupo XI (446 secuencias) incluyen las polifosfato-cinasas. Estas enzimas incluyen las polifosfato-cinasas (EC 2.7.4.1).

20 Las cinasas del Grupo XII (263 secuencias) incluyen las cinasas de membrana integral. El Grupo XII comprende la familia de las dolicol cinasas. Estas enzimas incluyen las dolicol cinasas (EC 2.7.1.108). El Grupo XII comprende además la familia de las undecaprenol cinasas. Estas enzimas incluyen las undecaprenol cinasas (EC 2.7.1.66).

25 Las cinasas desempeñan papeles indispensables en numerosas vías metabólicas y de señalización celular, y se encuentran entre las enzimas mejor estudiadas en los niveles estructural, bioquímico y celular. Pese al hecho de que todas las cinasas usan el mismo donador de fosfatos (en la mayoría de los casos, ATP) y catalizan aparentemente la misma reacción de transferencia de fosforilo, muestran una notable diversidad en sus plegamientos estructurales y sus mecanismos de reconocimiento del sustrato. Esto se debe probablemente en gran medida a la naturaleza extraordinariamente diversa de las estructuras y propiedades de sus sustratos.

2. Proteína-cinasas activadas por proteína-cinasas activadas por mitógenos (MK2 y MK3)

30 Se han definido diferentes grupos de proteína-cinasas activadas por MAPK (MAP-KAPK) en sentido descendente a partir de proteína-cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas enzimas transducen señales a proteínas diana que no son sustratos directos de las MAPK y, por tanto, sirven para retransmitir la señalización dependiente de la fosforilación con cascadas de MAPK para diversas funciones celulares. Uno de estos grupos está formado por las tres MAPKAPK: MK2, MK3 (también conocida como 3pK) y MK5 (también designada como PRAK). La proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos 2 (también referida como "MAPKAPK2", "MAPKAP-K2", "MK2") es una cinasa de la familia de las serina/treonina (Ser/Thr) proteína-cinasas. MK2 es altamente homóloga con MK3 (aproximadamente el 75 % de identidad de aminoácidos). Los dominios de cinasa de MK2 y MK3 son enormemente semejantes (identidad de aproximadamente el 35 % al 40 %) a la proteína-cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), la fosforilasa b cinasa y el dominio de cinasa en el extremo C (CTKD) de las isoformas de la cinasa S6 ribosómica (RSK). El gen *mk2* codifica dos transcritos cortados y empalmados alternativamente de 370 aminoácidos (MK2A) y 400 aminoácidos (MK2B). El gen *mk3* codifica un transcríto de 382 aminoácidos. Las proteínas MK2 y MK3 son altamente homólogas, aunque MK2A posee una región más corta en el extremo C. El extremo C de MK2B contiene una secuencia de localización nuclear bipartita funcional (NLS) (Lys-Lys-Xaa₁₀-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys) que no está presente en la isoforma MK2A más corta, lo que indica que el corte y empalme alternativo determina la localización celular de las isoformas MK2. MK3 posee una secuencia de localización nuclear similar. La secuencia de localización nuclear presente en MK2B y MK3 comprende un dominio D (Leu-Leu-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys) que según los estudios actúa como mediador en la interacción específica de MK2B y MK3 con p38 α y p38 β . MK2B y MK3 también poseen una señal de exportación nuclear funcional (NES) situada en el extremo N en el dominio D y NLS. NES en MK2B es suficiente para activar la exportación nuclear después de la estimulación, un proceso que puede ser inhibido por la leptomicina B. El extremo N de secuencia en el dominio catalítico en MK2 y MK3 es rico en prolina y contiene uno (MK3) o dos (MK2) posibles sitios de unión al dominio de homología Src 3 (SH3), que como han demostrado los estudios, para MK2, media en la unión al dominio SH3 de c-Abl *in vitro*. Estudios recientes sugieren que este dominio está implicado en la migración celular mediada por MK2.

55 MK2 y MK3 están situadas predominantemente en el núcleo de células quiescentes mientras que MK2A está presente en el citoplasma. Tanto MK2B como MK3 son exportadas rápidamente al citoplasma por medio de un mecanismo dependiente de una proteína de mantenimiento de región cromosómica (CRM1) tras estimulación por estrés. La exportación nuclear de MK2B parece estar mediada por la activación de cinasa, ya que la mutación

fosfomimética de Thr334 dentro del bucle de activación de la cinasa potencia la localización citoplásmica de MK2B. Sin estar limitado por ninguna teoría, se cree que MK2B y MK3 pueden contener una NLS constitutivamente activa y una NES regulada por fosforilación.

5 MK2 y MK3 parecen expresarse de forma ubicua, con expresión predominante en el corazón, en el músculo esquelético y en los tejidos renales,

2.1. Activación

Varios activadores de p38 α y p38 β estimulan con potencia la actividad de MK2 y MK3. p38 media en la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de MK2 en cuatro sitios dirigidos por prolina: Thr25, Thr222, Ser272 y Thr334. De estos sitios, sólo Thr25 no se conserva en MK3. Sin estar limitado por ninguna teoría, mientras que la función de Thr25 fosforilada no se conoce, su posición entre los dos sitios de unión al dominio SH3 sugiere que puede regular las interacciones proteína-proteína. Thr222 en MK2 (Thr201 en MK3) está situada en el bucle de activación del dominio de cinasa y ha demostrado que es esencial para la actividad de cinasa de MK2 y MK3. Thr334 en MK2 (Thr313 en MK3) está situada en el extremo C en el dominio catalítico y es esencial para la actividad de cinasa. La estructura cristalina de MK2 ha sido resuelta y, sin estar limitado por ninguna teoría, sugiere que la fosforilación de Thr334 puede servir como un activador para la importación y exportación nuclear de MK2. La fosforilación de Thr334 también puede debilitar o interrumpir la unión del extremo C de MK2 al dominio catalítico, exponiendo la NES y promoviendo la exportación nuclear.

20 Los estudios han demostrado que, mientras p38 es capaz de activar MK2 y MK3 en el núcleo, las evidencias experimentales sugieren que la activación y la exportación nuclear de MK2 y MK3 están acopladas por un activador conformacional dependiente de la fosforilación que también dicta la estabilización y localización de p38, y que la localización celular de p38 en sí está controlada por MK2 y posiblemente MK3. Estudios adicionales han revelado que el p38 nuclear es exportado al citoplasma en un complejo con MK2 después de la fosforilación y activación de MK2. La interacción entre p38 y MK2 puede ser importante para la estabilización de p38, ya que los estudios indican que los niveles de p38 son bajos en células con deficiencia de MK2 y la expresión de una proteína MK2 inactiva catalíticamente restaura los niveles de p38.

2.2. Sustratos y funciones

30 MK2 comparte muchos sustratos con MK3. Las dos enzimas tienen preferencias por sustratos comparables y fosforilan los sustratos peptídicos con constantes cinéticas similares. La secuencia mínima requerida para una fosforilación eficiente por MK2 se determinó como Hyd-Xaa-Arg-Xaa-pSer/Thr, en donde Hyd es un residuo hidrófobo voluminoso.

35 Las evidencias experimentales respaldan un papel para p38 en la regulación de la biosíntesis de citocinas y la migración celular. La delección dirigida del gen *mk2* en ratones sugería que aunque p38 media en la activación de muchas cinasas similares, MK2 parece ser la cinasa clave responsable de estos procesos biológicos dependientes de p38. La pérdida de MK2 conduce a (i) un defecto en la síntesis de citocinas inducida por lipopolisacáridos (LPS) como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6) e interferón gamma (IFN- γ) y (ii) cambios en la migración de fibroblastos embrionarios de ratón, células de músculo liso y neutrófilos. En concordancia con un papel de MK2 en las respuestas inflamatorias, los ratones con deficiencia en MK2 muestran una mayor susceptibilidad a infección por *Listeria monocytogenes* y una reducción en la muerte neuronal mediada por inflamación después de isquemia focal. Dado que los niveles de proteína p38 también están reducidos significativamente en células con deficiencia de MK2, fue necesario distinguir si estos fenotipos se debían exclusivamente a la pérdida de MK2. Para conseguirlo, se expresaron mutantes de MK2 en células con deficiencia de MK2, y los resultados indicaron que la actividad catalítica de MK2 no era necesaria para restaurar los niveles de p38 pero era precisa para regular la biosíntesis de las citocinas.

2.3. Regulación de la traducción de ARNm.

45 Los estudios han demostrado que la MK2 aumenta la producción de TNF α al incrementar la velocidad de traducción de su ARNm; no pudieron detectarse reducciones significativas en la transcripción, el procesamiento y la eliminación de TNF α en ratones con deficiencia de MK2. Se sabe que la vía de p38 desempeña un papel importante en la regulación de la estabilidad del ARNm, y MK2 representa una diana probable mediante la cual p38 ejerce su función de mediación. Estudios que usaban ratones con deficiencia de MK2 indicaron que la actividad catalítica de MK2 es necesaria por sus efectos en la producción y migración de citocinas, lo que sugiere que, sin estar limitado por ninguna teoría, MK2 fosforila las dianas que intervienen en la estabilidad del ARNm. En concordancia con esto, se ha constatado que MK2 se une a y/o fosforila la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) AO, tristetraprolina, la proteína de unión a poli(A) PABP1 y HuR (un miembro expresado ubicuamente de la familia elav (visual anómala letal embrionaria en *Drosophila melanogaster*) de la proteína de unión a ARN. Se sabe que estos sustratos se unen a o copurifican los ARNm que contienen elementos ricos en AU en la región 3' no traducida, lo que sugiere que MK2 puede regular la estabilidad de los ARNm ricos en AU como TNF α . En la actualidad se desconoce si MK3 tiene funciones similares, pero el tratamiento con LPS de fibroblastos con deficiencia en MK2 suprimió completamente la fosforilación AO de hnRNP, lo que sugiere que MK3 no es capaz de compensar la pérdida de

MK2.

MK3 participa con MK2 en la fosforilación de la cinasa del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2). La cinasa eEF2 fosforila e inactiva eEF2. La actividad de eEF2 es fundamental para la elongación del ARNm durante la traducción, y la fosforilación de eEF2 en Thr56 produce la terminación de la traducción de ARNm. La fosforilación de MK2 y MK3 de la cinasa eEF2 en Ser377 sugiere que estas enzimas pueden modular la actividad de cinasa eEF2 y con ello regulan la elongación de la traducción del ARNm.

5 MK3 participa con MK2 en la fosforilación de la cinasa del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2). La cinasa eEF2 fosforila e inactiva eEF2. La actividad de eEF2 es fundamental para la elongación del ARNm durante la traducción, y la fosforilación de eEF2 en Thr56 produce la terminación de la traducción de ARNm. La fosforilación de MK2 y MK3 de la cinasa eEF2 en Ser377 sugiere que estas enzimas pueden modular la actividad de cinasa eEF2 y con ello regulan la elongación de la traducción del ARNm.

2.4. Regulación transcripcional por MK2 y MK3.

La MK2 nuclear, similar a muchas MK, contribuye a la fosforilación de la unión del elemento de respuesta cAMP (CREB), el factor de respuesta sérica (SRF) y el factor de transcripción ER81. La comparación de células de tipo silvestre y con deficiencia en MK2 reveló que MK2 es la principal cinasa SRF inducida por estrés, lo que sugiere que MK2 tiene un papel en la respuesta inmediata-temprana mediada por estrés. MK2 y MK3 interaccionan con el factor de transcripción de hélice-bucle-hélice E47 *in vivo* y fosforilan E47 *in vitro*. Se determinó que la fosforilación mediada por MK2 de E47 reprime la actividad transcripcional de E47 y de este modo inhibe la expresión génica dependiente de E47, lo que sugiere que MK2 y MK3 pueden regular la expresión génica específica de tejidos y la diferenciación celular.

10 La MK2 nuclear, similar a muchas MK, contribuye a la fosforilación de la unión del elemento de respuesta cAMP (CREB), el factor de respuesta sérica (SRF) y el factor de transcripción ER81. La comparación de células de tipo silvestre y con deficiencia en MK2 reveló que MK2 es la principal cinasa SRF inducida por estrés, lo que sugiere que MK2 tiene un papel en la respuesta inmediata-temprana mediada por estrés. MK2 y MK3 interaccionan con el factor de transcripción de hélice-bucle-hélice E47 *in vivo* y fosforilan E47 *in vitro*. Se determinó que la fosforilación mediada por MK2 de E47 reprime la actividad transcripcional de E47 y de este modo inhibe la expresión génica dependiente de E47, lo que sugiere que MK2 y MK3 pueden regular la expresión génica específica de tejidos y la diferenciación celular.

15 La MK2 nuclear, similar a muchas MK, contribuye a la fosforilación de la unión del elemento de respuesta cAMP (CREB), el factor de respuesta sérica (SRF) y el factor de transcripción ER81. La comparación de células de tipo silvestre y con deficiencia en MK2 reveló que MK2 es la principal cinasa SRF inducida por estrés, lo que sugiere que MK2 tiene un papel en la respuesta inmediata-temprana mediada por estrés. MK2 y MK3 interaccionan con el factor de transcripción de hélice-bucle-hélice E47 *in vivo* y fosforilan E47 *in vitro*. Se determinó que la fosforilación mediada por MK2 de E47 reprime la actividad transcripcional de E47 y de este modo inhibe la expresión génica dependiente de E47, lo que sugiere que MK2 y MK3 pueden regular la expresión génica específica de tejidos y la diferenciación celular.

2.5. Otras dianas de MK2 y MK3.

Se han identificado también otros diversos sustratos de MK2 y MK3, que reflejan las diversas funciones de MK2 y MK3 en varios procesos biológicos. La proteína de armazón 14-3-3 ζ es un sustrato MK2 fisiológico. Los estudios indican que 14-3-3 ζ interacciona con diversos componentes de las vías de señalización celular, entre ellos proteína-cinasas, fosfatases y factores de transcripción. Estudios adicionales han mostrado que la fosforilación mediada por MK2 de 14-3-3 ζ en Ser58 compromete su actividad de unión, lo que sugiere que MK2 puede afectar a la regulación de varias moléculas de señalización reguladas normalmente por 14-3-3 ζ .

20 Estudios adicionales han mostrado que MK2 también interacciona con y fosforila la subunidad p16 del complejo de Arp2 y Arp3 de siete miembros (p16-Arc) en Ser77. P16-Arc tiene funciones en la regulación del citoesqueleto de actina, lo que sugiere que MK2 puede tomar parte en este proceso. Otros estudios han mostrado que la pequeña proteína de choque térmico HSP27, la proteína específica de linfocitos LSP-1 y la vimentina son fosforiladas por MK2. HSP27 tiene un interés especial dado que forma grandes oligómeros que pueden actuar como chaperonas moleculares y proteger a las células del choque térmico y el estrés oxidativo. Tras la fosforilación, HSP27 pierde su capacidad de formar grandes oligómeros y es incapaz de bloquear la polimerización de actina, lo que sugiere que la fosforilación mediada por MK2 de HSP27 actúa como una función homeostática dirigida a regular la dinámica de la actina que en caso contrario se desestabilizaría durante el estrés. Se ha comprobado también que MK3 fosforila HSP27 *in vitro* e *in vivo*, pero todavía no se ha determinado su papel durante condiciones de estrés.

25 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

30 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

35 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

40 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

45 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

50 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

55 MK2 y MK3 pueden también fosforilar la 5-lipoxigenasa. La 5-lipoxigenasa cataliza las etapas iniciales en la formación de los mediadores inflamatorios leucotrienos. También se ha demostrado que la tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt son fosforiladas por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora de tumores tuberina en Ser1210, creando un lugar de anclaje para 14-3-3. La tuberina y la hamartina forman normalmente un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular antagonizando la señalización dependiente de mTOR, lo que sugiere que la activación mediada por p38 de MK2 puede regular el crecimiento celular aumentando la unión de 14-3-3 a tuberina.

3. Inhibición de la cinasa

Las proteína-cinasas eucarióticas constituyen una de las superfamilias más grandes de proteínas homólogas que están relacionadas en virtud de sus dominios catalíticos. Las proteína-cinasas más relacionadas son específicas de la fosforilación de serina/treonina o de tirosina. Las proteína-cinasas desempeñan un papel integral en la respuesta celular a estímulos extracelulares. Así, la estimulación de las proteína-cinasas se considera uno de los mecanismos de activación más comunes en los sistemas de transducción de señales. Se conocen muchos sustratos que experimentan fosforilación por múltiples proteína-cinasas. Se ha publicado una cantidad de información considerable sobre la secuencia primaria de los dominios catalíticos de diversas proteína-cinasas. Estas secuencias comparten un gran número de residuos que intervienen en la unión a ATP, la catálisis y el mantenimiento de la integridad estructural. La mayoría de las proteína-cinasas poseen un dominio catalítico de 30-32 kDa bien conservado.

Los estudios han intentado identificar y usar elementos reguladores de las proteína-cinasas. Estos elementos reguladores incluyen inhibidores, anticuerpos y péptidos de bloqueo.

3.1. Inhibidores

Los inhibidores de enzimas son moléculas que se unen a las enzimas y reducen así la actividad enzimática. La unión de un inhibidor puede impedir que el sustrato entre en el sitio activo de la enzima y/u obstaculizar la acción de la enzima para catalizar su reacción. La unión al inhibidor es reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles reaccionan normalmente con la enzima y la modifican químicamente (p. ej., modificando los residuos de

aminoácidos clave necesarios para la actividad enzimática) de manera que ya no es capaz de catalizar su reacción. En cambio, los inhibidores reversibles se unen de forma no covalente y se producen diferentes tipos de inhibición dependiendo de si estos inhibidores se unen a la enzima, al complejo enzima-sustrato o a ambos.

5 Los inhibidores de enzimas a menudo se evalúan según su especificidad y su potencia. El término "especificidad" como se usa en este contexto se refiere a la fijación selectiva de un inhibidor o su falta de unión a otras proteínas. El término "potencia" como se usa en la presente memoria se refiere a una constante de disociación del inhibidor, que indica la concentración de inhibidor necesaria para inhibir una enzima.

10 Los inhibidores de las proteína-cinásas se han estudiado para su uso como una herramienta en la regulación de la actividad de las proteína-cinásas. Los inhibidores han sido estudiados para su uso, por ejemplo, con la cinasa dependiente de ciclina (Cdk), cinasa MAP, serina/treonina-cinasa, proteína tirosina-cinasa de la familia Src, tirosina-cinasa, calmodulina (CaM)-cinasa, caseína-cinasa, cinasa de punto de verificación (Chkl), glucógeno sintasa-cinasa 3 (GSK-3), c-Jun cinasa en el extremo N (JNK), proteína-cinasa activada por mitógenos 1 (MEK), cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), proteína-cinasa A, Akt (proteína-cinasa B), proteína-cinasa C, proteína-cinasa G, proteína tirosina-cinasa, cinasa Raf y cinasa Rho.

15 3.2. Anticuerpos

20 Los anticuerpos son proteínas séricas cuyas moléculas poseen pequeñas áreas de su superficie que son complementarias con pequeños grupos químicos en sus dianas. Estas regiones complementarias (referidas como sitios de combinación de anticuerpos o sitios de unión a antígeno) de las que hay al menos dos por molécula de anticuerpo, y en algunos tipos de moléculas de anticuerpos diez, ocho, o en algunas especies hasta 12, pueden reaccionar con su región complementaria correspondiente en el antígeno (el determinante antigenógeno o epitopo) para unir varias moléculas de antígeno multivalente entre sí y formar una retícula.

25 La unidad estructural básica de una molécula de anticuerpo completa consiste en cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas ligeras (L) idénticas (cada una de las cuales contiene aproximadamente 220 aminoácidos) y dos cadenas pesadas (H) idénticas (cada una de las cuales contiene normalmente en torno a 440 aminoácidos). Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras se mantienen unidas por una combinación de enlaces no covalentes y covalentes (disulfuro). La molécula está compuesta por dos mitades idénticas, cada una con un sitio de unión a antígeno idéntico compuesto por la región en el extremo N de una cadena ligera y la región en el extremo N de una cadena pesada. Las cadenas ligeras y pesadas cooperan normalmente para formar la superficie de unión a antígeno.

30 Los anticuerpos humanos muestran dos clases de cadenas ligeras, κ y λ ; las moléculas individuales de inmunoglobulina son generalmente sólo una o la otra. En el suero normal, se ha encontrado que el 60 % de las moléculas tienen determinantes κ y el 30 % λ . Se han encontrado otras muchas especies que muestran dos clases de cadenas ligeras, aunque sus proporciones varían. Por ejemplo, en el ratón y la rata, las cadenas λ comprenden un bajo porcentaje del total; en el perro y el gato, las cadenas κ son muy bajas; el caballo no parece tener ninguna cadena κ ; los conejos pueden tener del 5 al 40 % de λ , dependiendo de la cepa y el alotipo del locus b; y las cadenas ligeras de los pollos son más homólogas a λ que a κ .

35 En los mamíferos existen cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uno con su propia clase de cadena pesada: α (para IgA), δ (para IgD), ϵ (para IgE), γ (para IgG) y μ (para IgM). Además, existen cuatro 40 subclases de inmunoglobulinas IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) que tienen las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$ respectivamente. En su forma secretada, IgM es un pentámero compuesto por cinco unidades de cuatro cadenas, para dar un total de 10 sitios de unión a antígeno. Cada pentámero contiene una copia de una cadena J, que está insertada covalentemente entre dos regiones de cola adyacentes.

45 Las cinco clases de inmunoglobulinas se diferencian de otras proteínas séricas en que muestran un amplio intervalo de movilidad electroforética y no son homogéneas. Esta heterogeneidad –por la que las moléculas de IgG individuales, por ejemplo, se diferencian entre sí en la carga neta– es una propiedad intrínseca de las inmunoglobulinas.

50 Los anticuerpos monoclonales (AMc) pueden generarse fusionando células de bazo de ratón de un donante inmunizado con una línea celular de mieloma de ratón para producir clones de hibridoma de ratón establecidos que crecen en medios selectivos. Una célula de hibridoma es una célula híbrida inmortalizada que procede de la fusión *in vitro* de un linfocito B secretor de anticuerpos con una célula de mieloma. La inmunización *in vitro*, que se refiere a la activación primaria de linfocitos B específicos de antígeno en cultivo, es otro medio bien establecido de producir anticuerpos monoclonales de ratón.

55 Las diversas bibliotecas de genes variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_{κ} y V_{λ}) de inmunoglobulinas procedentes de linfocitos de la sangre periférica también pueden amplificarse mediante amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes que codifican cadenas de polipéptidos individuales en las que los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras están unidos por un separador de polipéptidos (cadena única Fv o scFv) pueden prepararse combinando aleatoriamente genes V de cadena pesada y ligera usando PCR. A

continuación puede clonarse una biblioteca combinatoria para su presentación en la superficie de bacteriófagos filamentosos por fusión a una proteína de recubrimiento menor en el extremo del fago.

La técnica de selección guiada se basa en recombinación de genes V de inmunoglobulina humana con genes V de inmunoglobulina de roedores. El método comprende (i) recombinación de un repertorio de cadenas ligeras λ humanas con el dominio de la región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal de ratón reactivo con un antígeno de interés; (ii) selección de Fab semihumanas en ese antígeno; (iii) uso de genes de cadena ligera λ seleccionados como "dominios de anclaje" para una biblioteca de cadenas pesadas humanas en una segunda recombinación para aislar fragmentos de Fab clónicos que tienen genes de cadena ligera humana; (v) transfección de células de mieloma de ratón por electroporación con vectores de expresión de células de mamíferos que contienen los genes; y (vi) expresión de los genes V del Fab reactivo con el antígeno como una molécula de anticuerpo λ IgG1 completa en el mieloma de ratón.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos presentes en la naturaleza y no naturales. Específicamente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, y fragmentos de los mismos. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos químicos y anticuerpos totalmente sintéticos y fragmentos de los mismos.

Un determinante antigeno o epítopo es un sitio antigeno en una molécula. Los determinantes antigenicos/epitopos en secuencia son esencialmente cadenas lineales. En estructuras ordenadas, como los polímeros o proteínas helicoidales, los determinantes antigenicos/epitopos serían esencialmente regiones limitadas o segmentos en o sobre la superficie de la estructura que implican cadenas laterales de aminoácidos de diferentes porciones de la molécula que podrían acercarse entre sí. Son determinantes conformatacionales. Como se usa en la presente memoria, un epítopo puede ser un determinante antigeno/sitio de unión a antígeno en un péptido inhibidor de cinasa. El epítopo puede estar relacionado con una secuencia primaria, secundaria o terciaria.

El principio de complementariedad, que a menudo se compara con el encaje de una llave en una cerradura, implica fuerzas de unión relativamente débiles (hidrófobas y enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas), que son capaces de actuar de manera eficaz sólo cuando las dos moléculas de la reacción pueden acercarse mucho entre sí y de hecho de forma tan próxima que el átomo o grupos de átomos constituyentes que sobresalen de una molécula pueden encajar en las depresiones o rebajes complementarios del otro. Las interacciones antígeno-anticuerpo muestran un alto grado de especificidad, que se manifiesta a muchos niveles. En la escala molecular, especificidad significa que los sitios de combinación de anticuerpos con un antígeno tienen una complementariedad nada similar a los determinantes antigenicos de un antígeno no relacionado. Siempre que los determinantes antigenicos de dos antígenos diferentes tengan cierta similitud estructural, puede producirse un cierto grado de encaje de un determinante en el sitio de combinación de algunos anticuerpos en el otro, de manera que este fenómeno da lugar a reacciones cruzadas. Las reacciones cruzadas son de gran importancia para comprender la complementariedad o especificidad de las reacciones de antígeno-anticuerpo. La especificidad o complementariedad inmunológica hace posible la detección de pequeñas cantidades de impurezas/contaminaciones entre antígenos.

La especificidad de las interacciones entre ciertos anticuerpos y proteína-cinasas se ha estudiado para su uso en la regulación de la actividad de las proteína-cinasas. Por ejemplo, se han aislado anticuerpos para su uso con las vías de cinasa MAP, proteína-cinasa A, proteína-cinasa B, proteína-cinasa G, serina/treonina-cinasas, glucógeno-sintasa-cinasa-3 (GSK-3), proteína (SAP) cinasa activada por estrés y tirosina-cinasas. Adicionalmente, se han aislado anticuerpos para su uso con inhibidores de proteína-cinasas y sustratos de proteína-cinasas.

3.3. Péptidos de bloqueo

Un péptido es un compuesto químico que está formado por una cadena de dos o más aminoácidos mediante la cual el grupo carboxilo de un aminoácido en la cadena está unido al grupo amino del otro por medio de un enlace peptídico. Los péptidos se han usado entre otros en el estudio de la estructura y función de las proteínas. Los péptidos sintéticos pueden usarse entre otros como sondas para ver dónde se producen las interacciones proteína-péptido. Los péptidos inhibidores pueden usarse entre otros en la investigación clínica para examinar los efectos de los péptidos en la inhibición de proteína-cinasas, proteínas del cáncer y otros trastornos.

Se ha estudiado el uso de varios péptidos de bloqueo. Por ejemplo, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), una proteína-cinasa MAPK, es esencial para la proliferación y diferenciación celular. La activación de MAPK requiere un mecanismo en cascada por el cual MAPK es fosforilada por una MAPKK en la dirección ascendente (MEK) que a continuación es, a su vez, fosforilada por una tercera cinasa MAPKKK (MEKK). El péptido inhibidor ERK actúa como un señuelo MEK mediante la unión a ERK. Contiene los 13 aminoácidos en el extremo amino (GMPKKKPTPIQLN) [SEQ ID NO: 1] de MEK1 y se une ERK. Así se bloquea la activación de ERK mediante MEK ya que ERK es incapaz de interaccionar con MEK. El péptido inhibidor ERK contiene también una secuencia de transducción de proteínas (PTD) (DRQIKIWFQNRRMKWKK) [SEQ ID NO: 2] derivada de *Antennapedia* que convierte en permeable la célula peptídica.

Otros péptidos de bloqueo incluyen el péptido inhibidor relacionado con autocamtida-2 (AIP). Este péptido sintético

5 es un inhibidor potente y muy específico de la proteína-cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII). AIP es un análogo no fosforilable de autocamtida-2, un sustrato de péptido altamente selectivo para CaMKII. AIP inhibe CaMKII con una IC_{50} de 100 nM (IC_{50} es la concentración de un inhibidor necesaria para obtener una inhibición del 50 %). La inhibición de AIP es no competitiva con respecto a sintida-2 (sustrato peptídico CaMKII) y ATP aunque es competitiva con respecto a autocamtida-2. La inhibición no se ve afectada por la presencia o ausencia de Ca^{2+} /calmodulina. La actividad de CaMKII es inhibida completamente por AIP (1 μM) mientras que PKA, PKC y CaMKIV no se ven afectados. La secuencia de aminoácidos de AIP es: KKALRRQEAVDAL (Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Ala-Leu) [SEQ ID NO: 3].

10 Otros péptidos de bloqueo incluyen el péptido inhibidor de proteína-cinasa de división celular 5 (Cdk5) (CIP). Cdk5 fosforila la proteína de microtúbulos tau en fosfoepítotos específicos de la enfermedad de Alzheimer cuando se asocia con p25. p25 es un activador truncado, que se produce a partir del activador Cdk5 fisiológico p35 tras la exposición a péptidos amiloides β (A β). Tras infecciones neuronales con CIP, los CIP inhiben selectivamente la actividad de p25/Cdk5 y suprimen la fosforilación tau aberrante en neuronas corticales. Los motivos de la especificidad demostrada por CIP no se comprenden completamente.

15 15 Se han estudiado péptidos de bloqueo adicionales en relación con cinasa de regulación extracelular 2 (ERK2), ERK3, p38/HOG1, proteína-cinasa C, caseína-cinasa II, Ca^{2+} /calmodulina-cinasa IV, caseína-cinasa II, Cdk4, Cdk5, proteína-cinasa dependiente de ADN (ADN-PK), serina/treonina-proteína-cinasa PAK3, fosfoinositida (PI)-3 cinasa, PI-5 cinasa, PSTAIRE (la secuencia cdk altamente conservada), cinasa S6 ribosómica, GSK-4, cinasa de centro germinal (GCK), SAPK (proteína-cinasa activada por estrés), SEK1 (cinasa de señalización por estrés) y cinasa de adhesión focal (FAK).

20 20 3.4. Dominio de transducción de proteínas

25 Los dominios de transducción de proteínas (PTD) forman una clase de péptidos capaces de penetrar en la membrana plasmática de las células de mamífero y de transportar compuestos de muchos tipos y pesos moleculares a través de la membrana. Estos compuestos incluyen moléculas efectoras, como proteínas, ADN, péptidos conjugados, oligonucleótidos y pequeñas partículas como liposomas. Cuando los PTD están unidos químicamente o fusionados con otras proteínas, las proteínas de fusión resultantes siguen siendo capaces de entrar en las células. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de transducción, no se cree que la internalización de estas proteínas esté mediada por receptores o mediada por transportadores. Los PTD tienen generalmente 10-16 aminoácidos de longitud y pueden agruparse según su composición, como, por ejemplo, péptidos ricos en arginina y/o lisina.

30 30 El uso de PTD capaces de transportar moléculas efectoras en células se ha hecho cada vez más atractivo en el diseño de fármacos ya que promueve la captación celular de moléculas de carga. Estos péptidos de penetración en células, clasificados generalmente como anfípáticos (lo que significa que tienen un extremo polar y uno no polar) o catiónicos que dependen de su secuencia, proporcionan una tecnología de suministro no invasiva para macromoléculas. Los PTD se refieren también a menudo como "péptidos troyanos", "secuencias de translocación de membrana" o "proteínas permeables celulares" (CPP). Los PTD también pueden usarse para ayudar a que los nuevos inhibidores de cinasa HSP27 penetren en las membranas celulares (véanse las solicitudes de EE.UU. nº serie 11/972.459, titulada "Inhibidores polipeptídicos de cinasa HSP27 y usos de los mismos", presentada el 10 de enero de 2008, y nº serie 12/188.109, titulada "Inhibidores de cinasas y usos de los mismos", presentada el 7 de agosto de 2008).

40 40 3.4.1. Proteínas que contienen PTD víricos

45 Las primeras proteínas que se describieron como poseedoras de propiedades de transducción eran de origen vírico. Estas proteínas siguen siendo los modelos más comúnmente aceptados de acción de PTD. El Transactivador de Transcripción (TAT) de VIH-1 y la proteína VP 22 de VHS-1 son las proteínas que contienen PTD víricos mejor caracterizadas.

50 50 TAT (producto génico transactivador de VIH-1) es un polipéptido de 86 aminoácidos, que actúa como un potente factor de transcripción del genoma de VIH-1 integrado. TAT actúa sobre el genoma vírico que estimula la replicación vírica en células con infección latente. Las propiedades de translocación de la proteína TAT le permiten activar células infectadas quiescentes y pueden intervenir en el cebado de células no infectadas para una infección posterior regulando muchos genes celulares, que incluyen las citocinas. El PTD mínimo de TAT es la secuencia de proteínas de 9 aminoácidos RKKRRQRRR (TAT₄₉₋₅₇) [SEQ ID NO: 4]. Estudios que usaron un fragmento de TAT más largo mostraron una transducción con éxito de proteínas de fusión de hasta 120 kDa. La adición de múltiples TAT-PTD así como derivados sintéticos de TAT ha mostrado capacidad para mediar en la translocación de membrana. El TAT PTD que contiene proteínas de fusión se ha usado como fracciones terapéuticas en experimentos que implican cáncer, transportando una proteína mortal a las células, y modelos patológicos de trastornos neurodegenerativos.

55 VP22 es la proteína de tegumento de VHS-1, una parte estructural del virión VHS. VP22 es capaz de translocación independiente del receptor y se acumula en el núcleo. Esta propiedad de VP22 clasifica la proteína como un péptido que contiene PTD. La proteínas de fusión que comprenden VP22 de longitud completa han sido translocadas de

manera eficaz a través de la membrana plasmática.

3.4.2. Homeoproteínas con propiedades de translocación intercelular

Las homeoproteínas son factores de transcripción de transactivación altamente conservados que intervienen en procesos morfológicos. Se unen a ADN a través de una secuencia específica de 60 aminoácidos. El homeodominio de unión a ADN es la secuencia más conservada de la homeoproteína. Se han descrito varias homeoproteínas que muestran actividad de tipo PTD; son capaces de una translocación eficiente a través de las membranas celulares de una forma independiente de la energía e independiente de la endocitosis sin especificidad de tipo celular.

La proteína Antennapedia (Antp) es un factor de transactivación capaz de translocación a través de membranas celulares; la secuencia mínima capaz de translocación es un péptido de 16 aminoácidos que corresponde a la tercera hélice del homeodominio (HD) de la proteína. La internalización de esta hélice tiene lugar a 4°C, lo que sugiere que este proceso no es dependiente de la endocitosis. Los péptidos de hasta 100 aminoácidos producidos como proteínas de fusión con AntpHD penetran en las membranas celulares. Otros homeodominios capaces de translocación incluyen los homeodominios Fushi tarazu (Ftz) y Engrailed (En). Muchos homeodominios comparten una tercera hélice altamente conservada.

3.4.3. PTD sintéticos

Se han sintetizado varios péptidos PTD. Muchos de estos péptidos sintéticos se basan en péptidos existentes y bien documentados, mientras que otros se seleccionan por sus residuos básicos y/o su carga positiva, que según se cree generalmente son cruciales para la función de PTD. Los péptidos sintéticos incluyen, pero no se limitan a, PTD-4 (YARAARQARA) [SEQ ID NO: 5]; PTD-5 (RRQRRTSKLMKR) [SEQ ID NO: 6]; MST-1 (AAVLLPVLLAAR) [SEQ ID NO: 7]; L-R9 (RRRRRRRRR) [SEQ ID NO: 8]; y péptido 2 (SGWFRRWKK) [SEQ ID NO: 9].

3.4.4. PTD humanos

Los PTD humanos pueden sortear las posibles cuestiones relativas a la inmunogenicidad tras su introducción en un paciente humano. Los péptidos con secuencias de PTD incluyen: Hoxa-5, Hox-A4, Hox-B5, Hox-B6, Hox-B7, HOXD3, GAX, MOX-2 y FtzPTD. Todas estas proteínas comparten la secuencia presente en AntpPTD (RQIKIWFQNRRMKWKK) [SEQ ID NO: 10]. Otros PTD incluyen Islet-1, interleucina-1β, factor de necrosis tumoral y la secuencia hidrófoba del péptido de señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF o FGF-4), que es capaz de translocación independiente de la energía, el receptor y la endocitosis. Los PTD no confirmados incluyen miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

4. Trastornos: trastornos inflamatorios

El término "inflamación" como se usa en la presente memoria se refiere al proceso fisiológico por el que los tejidos vascularizados responden a una lesión. Véase, p. ej., FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 4^a Ed., William E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1999) en 1051-1053, incorporado en la presente memoria como referencia. Durante el proceso inflamatorio, las células implicadas en la desintoxicación y la reparación son movilizadas hacia el sitio comprometido por mediadores inflamatorios. La inflamación se caracteriza a menudo por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de inflamación, en particular neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promueven el daño en el tejido liberando sustancias tóxicas en la pared vascular o en tejido no lesionado. Tradicionalmente, la inflamación se ha dividido en respuestas agudas y crónicas.

La expresión "inflamación aguda" como se usa en la presente memoria se refiere a la respuesta rápida, breve (de minutos a días) y relativamente uniforme a una lesión aguda caracterizada por acumulaciones de fluido, proteínas plasmáticas y leucocitos neutrófilos. En la inflamación aguda, la eliminación del estímulo interrumpe el reclutamiento de monocitos (que se convierten en macrófagos bajo la activación apropiada) en el tejido inflamado, y los macrófagos existentes salen del tejido por los vasos linfáticos. Los ejemplos de agentes lesivos que provocan inflamación aguda incluyen, pero no se limitan a, patógenos (p. ej., bacterias, virus, parásitos), cuerpos extraños de fuentes exógenas (p. ej., asbestos) o endógenas (p. ej., cristales de urato, complejos inmunitarios) y agentes físicos (p. ej., quemaduras) o químicos (p. ej., cáusticos).

La expresión "inflamación crónica" como se usa en la presente memoria se refiere a inflamación que es de mayor duración y que tiene una terminación vaga e indefinida. La inflamación crónica tiene lugar cuando la inflamación aguda persiste, ya sea a través del aclaramiento incompleto del agente inflamatorio inicial o como consecuencia de múltiples acontecimientos agudos que suceden en el mismo lugar. La inflamación crónica, que incluye el aflujo de linfocitos y macrófagos y el crecimiento de fibroblastos, puede producir cicatrización del tejido en lugares de actividad inflamatoria prolongada o repetida. En la inflamación crónica, los macrófagos existentes quedan anclados en el lugar y se estimula la proliferación de macrófagos.

Con independencia del agente iniciador, los cambios fisiológicos que acompañan a la inflamación aguda comprenden cuatro características principales: (1) la vasodilatación, que produce un aumento neto en el flujo sanguíneo, es una de las primeras respuestas físicas a la lesión aguda de los tejidos; (2) en respuesta a estímulos inflamatorios, las células endoteliales que revisten las vérulas se contraen, ensanchando las uniones intracelulares

para producir huecos que conducen a un aumento de la permeabilidad vascular que hace posible la filtración de proteínas plasmáticas y glóbulos sanguíneos fuera de los vasos sanguíneos; (3) la inflamación se caracteriza a menudo por una fuerte infiltración de leucocitos en el lugar de inflamación, en particular neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promueven el daño en el tejido liberando sustancias tóxicas en la pared vascular o en un tejido no lesionado; y (4) fiebre, producida por pirógenos liberados de leucocitos en respuesta a estímulos específicos.

Durante el proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios solubles de la respuesta inflamatoria trabajan junto con los componentes celulares de una forma sistémica en el intento por contener y eliminar los agentes que ocasionan sufrimiento físico. La expresión "mediadores inflamatorios" como se usa en la presente memoria se refiere a los mediadores moleculares del proceso inflamatorio. Estas moléculas solubles difusibles actúan tanto localmente en el lugar del daño tisular y la infección como en sitios más alejados. Algunos mediadores inflamatorios son activados por el proceso inflamatorio, mientras que otros son sintetizados y/o liberados desde fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o por otros mediadores inflamatorios solubles. Los ejemplos de mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria incluyen, pero no se limitan a, proteasas plasmáticas, complemento, cininas, proteínas de coagulación y fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor de activación de plaquetas (PAF), péptidos y aminas, que incluyen pero no se limitan a histamina, serotonina y neuropéptidos, citocinas proinflamatorias, que incluyen pero no se limitan a interleucina-1, interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma e interleucina 12 (IL-12).

Varios trastornos asociados con la inflamación subyacen a diversas enfermedades. Estas incluyen, pero no se limitan a, asma, enfermedades autoinmunitarias, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), lesión por reperfusión, artritis reumatoide, vasculitis e hipersensibilidades.

Asma

El asma es una enfermedad crónica que afecta al sistema respiratorio en la que las vías respiratorias pueden estrecharse esporádicamente, inflamarse y estar revestidas por cantidades excesivas de moco, a menudo en respuesta a uno o más desencadenantes. Estos desencadenantes pueden incluir, pero no se limitan a, exposición a estimulantes ambientales como, pero sin limitarse a, alérgenos, humo, aire frío o caliente, perfumes, caspa de los animales domésticos, aire húmedo, ejercicio o actividad física o sufrimiento emocional. El estrechamiento de las vías respiratorias presenta síntomas que incluyen, pero no se limitan a, sibilancias, falta de respiración, opresión en el pecho, tos, disnea y estridor. Los niveles séricos elevados de IL-6 en sujetos con asma en comparación con sujetos de control normales se han relacionado con la fisiopatología del asma bronquial. Yokoyama, A. y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151(5): 1354-58 (1995). Los estudios sugieren también, basándose en la observación de que se detectaron niveles importantes de TNF- α e IL-6 en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de pacientes con asma, mientras los niveles de IL-1 β en el LLBA de pacientes con asma asintomática, activación de macrófagos alveolares y linfocitos T (Broide, D.H., y col. J. Allergy Clin. Immunol. 89(5):958-67, 1992).

Enfermedades autoinmunitarias

La espondilitis anquilosante (EA, enfermedad de Bechterew, síndrome de Bechterew, enfermedad de Marie Strumpell) es una artritis inflamatoria y enfermedad autoinmunitaria crónica. Afecta principalmente a la columna y al sacroiliaco en la pelvis, causando finalmente la fusión en la columna. Los estudios han referido que en los pacientes con EA aumentan TNF- α e IL-6 (mientras que no lo hacen los niveles de IL-1 β) y que IL-6 está correlacionada estrechamente con la actividad de la enfermedad (Gratacos, J., y col. Br. J. Rheumatol. 33(10):927-931. 1994). Los síntomas de EA incluyen, pero no se limitan a, dolor crónico y rigidez en la parte inferior de la columna o en ocasiones en toda la columna, a menudo con dolor referido a una u otra nalga o la parte posterior del muslo desde la articulación sacroiliaca, inflamación del ojo (iritocicitis, uveítis) que causa enrojecimiento, dolor ocular, pérdida de visión, moscas volantes, fotofobia, fatiga, náuseas, aortitis, fibrosis pulmonar apical y ectasia de las vainas de las raíces del nervio sacro.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria en la que las células de los islotes sufren el ataque de los linfocitos T, con lo cual el cuerpo es incapaz de producir insulina. Se ha señalado que la insulitis destructiva de las células β está asociada con la expresión de IL-1 y TNF- α . Además, la expresión transgénica de citocinas en las células β de los islotes pancreáticos de ratones no propensos a la diabetes y ratones no obesos diabéticos (NOD) ha sugerido unos papeles patógenos para IFN α , IFN γ , IL-2 e IL-10 en el desarrollo de diabetes mellitus insulinodependiente (DMID) y papeles protectores para IL-4, IL-6 y TNF- α (Rabinovitch, A. Diabetes Metab. Rev. 14:129-151, 1998). Los síntomas de la diabetes tipo 1 incluyen, pero no se limitan a, poliuria, polidipsia y pérdida de peso.

55 El síndrome de Guillain-Barré es una polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (un trastorno autoinmunitario que afecta al sistema nervioso periférico). Frecuentemente es grave, y normalmente se muestra como una parálisis ascendente observada por debilidad en las piernas que se extiende a las extremidades superiores y la cara junto con pérdida completa de reflejos tendinosos profundos. Los estudios han referido que la expresión diferencial de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en un modelo animal de la enfermedad apunta en favor de una mayor importancia de estas

5 citocinas (Zhu, J., y col. Clin. Immunol. Immunopathol. 84(1):85-94. 1997). Los síntomas del síndrome de Guillain-Barré incluyen, pero no se limitan a, debilidad simétrica que afecta normalmente primero a las extremidades inferiores, y progresa rápidamente de forma ascendente, "piernas de caucho" con o sin disestesias, debilidad bulbar (disfagia orofaríngea), dificultades respiratorias, debilidad facial, pérdida sensitiva (propiocepción), amplias fluctuaciones en la presión arterial, hipotensión ortostática y arritmias cardiacas.

10 El lupus es una enfermedad autoinmunitaria crónica del tejido conjuntivo, que afecta a cualquier parte del cuerpo, causando inflamación y daño en los tejidos. El lupus daña con la mayor frecuencia el corazón, las articulaciones, la piel, los pulmones, los vasos sanguíneos, el hígado, los riñones y el sistema nervioso. Los estudios han mostrado que IL-6 y TNF- α son sintetizados activamente en los riñones de los pacientes con nefritis por lupus (Herrera-Esparza, R., y col. Lupus. 7(3): 154-158, 1998). Estudios adicionales han comunicado que la expresión de TNF- α e IL-1 β está elevada en los modelos animales de nefritis por lupus (Boswell, J., y col. J. Immunol. 141(9):3050-3054, 1988). Los síntomas de lupus incluyen, pero no se limitan a, fatiga, fiebre, aumento o pérdida de peso, dolor en las articulaciones, rigidez, tumefacción, exantema malar en la cara, lesiones cutáneas, llagas en la boca, alopecia, falta de respiración, dolor torácico, sequedad ocular y fenómeno de Raynaud.

15 20 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmunitaria que afecta a las neuronas mielinizadas del encéfalo y la médula espinal. La EM es causada por daño en la vaina de mielina; los impulsos nerviosos se enlentecen o se detienen cuando se daña esta cubierta. Los estudios han referido un aumento de la expresión de TNF- α en casos de EM (Cannella, D., y col. Ann. Neurol. 37(4):424-435, 2004) y de IL-6 en lesiones de los pacientes con EM (Lock, C, y col. Nature Medicine, 8:500-508, 2002). Los síntomas de esclerosis múltiple incluyen, pero no se limitan a, pérdida de equilibrio, espasmos musculares, entumecimiento o sensación anómala en cualquier área, problemas para mover los brazos o las piernas y en la deambulación, temblor en uno o más entre los brazos y las piernas, estreñimiento, pérdida de heces, incontinencia, visión doble, molestias oculares, dolor facial y pérdida de audición.

25 La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria crónica no contagiosa que afecta a la piel y las articulaciones. Comúnmente provoca la aparición de manchas rojas y escamosas en la piel. Estas placas psoriásicas son áreas de inflamación y producción excesiva de piel. La piel se acumula rápidamente en estos sitios y adopta un aspecto blanco plateado. Las placas pueden afectar a cualquier zona, lo que incluye el codo, la rodilla, el cuero cabelludo y los genitales. Los estudios han referido niveles elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los pacientes con psoriasis (Mizutani, H.; y col. J. Dermatol. Sci, 14(2): 145-153. 1997).

30 35 40 La esclerodermia es una enfermedad extensa del tejido conjuntivo que implica cambios en la piel, los vasos sanguíneos, los músculos y los órganos internos. Los estudios han referido que se detectó con más frecuencia IL-6 en los sueros de pacientes con esclerodermia que en los sueros de los controles, y que TNF- α se detectó en los mismos niveles en los dos grupos de pacientes, mientras que IL-1 β no se detectó en ninguno de los grupos (Needleman, B. W., y col. Arthritis Rheum. 35(1):67-72, 1992). Los síntomas cutáneos incluyen, pero no se limitan a, blanqueamiento, azuleo o enrojecimiento de los dedos de las manos y los pies en respuesta al calor y al frío (fenómeno de Raynaud), pérdida de pelo, dureza cutánea, piel de color anómalamente oscuro o claro, engrosamiento de la piel y manos y antebrazos brillantes, y úlceras en la punta de los dedos de la mano y del pie. Los síntomas óseos y musculares incluyen, pero no se limitan a, dolor en las articulaciones, entumecimiento y dolor en los pies, dolor, rigidez y tumefacción de los dedos de las manos y las articulaciones, dolor en la muñeca. Los síntomas adicionales incluyen, pero no se limitan a, estreñimiento, diarrea, tos seca, sibilancias y dificultad en la deglución.

45 La enfermedad de Sjögren (enfermedad de Mikulicz, síndrome de Sicca) es un trastorno autoinmunitario en el que las células inmunitarias atacan y destruyen las glándulas exocrinas que producen lágrimas y saliva. Los estudios han mostrado que los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α son significativamente diferentes entre los pacientes con enfermedad de Sjögren y los controles sanos normales (Szodoray, P., y col. Scand. J. Immunol. 59(6):592-599). Los síntomas de enfermedad de Sjögren incluyen, pero no se limitan a, boca seca, ojos secos, sequedad de la piel, sequedad nasal y sequedad vaginal.

Glomerulonefritis

50 55 La glomerulonefritis (nefritis glomerular, GN) es una enfermedad renal caracterizada por inflamación de los pequeños vasos sanguíneos (glomérulos) del riñón. Los estudios han referido que las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF- α desempeñan cada una un papel en el proceso inmunitario/inflamatorio en la glomerulonefritis y que el bloqueo de su acción reduce la enfermedad (Atkins, R.C.. Nephrology. 7(s1):S2-S6, 2007); Johnson, R.J., Nephron. 73(4):506-514, 1996). Estudios adicionales han comunicado que IL-6 desempeña también un papel en la glomerulonefritis (Takemura, T., y col. Virchows Archiv. 424(5):459-464, 1994). Los síntomas de glomerulonefritis incluyen, pero no se limitan a, edema, alta presión arterial y presencia de glóbulos rojos en la orina.

55 Dolor pélvico crónico urológico

Los síndromes de dolor pélvico crónico urológico refieren síndromes dolorosos asociados con la vejiga (es decir, cistitis intersticial (CI), síndrome de la vejiga dolorosa (SVD) y la próstata (prostatitis crónica (PC), síndrome de dolor pélvico crónico (SDPC). La prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico (PC/SDPC) se caracteriza por dolor

pélvico o perineal sin evidencia de infección de las vías urinarias, que dura más de 3 meses. Los estudios han referido que los niveles de IL-1 β , TNF- α e IL-6 estaban significativamente elevados en los grupos que tienen SDPC inflamatorio y no inflamatorio que en un grupo de control (Orhan, L., y col. Int. J. Urol. 8(9):495-9, 2001; Alexander, R.B., y col. Urology. 52(5):744-749, 1998; Jang, T.L., y Schaeffer, A.J., World J. Urol. 21(2):95-99, 2003). Los síntomas de estos síndromes pueden aparecer y desaparecer. El dolor puede estar comprendido entre unas molestias leves y ser debilitante, y puede irradiar desde la espalda y el recto, dificultando la sedestación. Puede existir disuria (micción difícil o dolorosa), artralgia (dolor en una articulación), mialgia (dolor en los músculos), fatiga inexplicada, dolor abdominal, dolor urente constante en el pene y frecuencia urinaria. La micción frecuente y el aumento de la urgencia pueden sugerir cistitis intersticial (inflamación centrada en la vejiga, más que en la próstata). La eyaculación puede ser dolorosa, ya que la próstata se contrae durante la emisión de semen, aunque es más común un dolor posteyacular mediado por los nervios y los músculos. Algunos pacientes refieren baja libido, disfunción sexual y dificultades eréctiles. El dolor después de la eyaculación es una queja muy específica que distingue la PC/SDPC de hombres con hiperplasia prostática benigna (HPB) o de sujetos sanos normales.

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La expresión "enfermedad inflamatoria intestinal (EII)" se refiere a un grupo de dolencias inflamatorias del intestino grueso y el intestino delgado. Las EII incluyen la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Otras formas de EII incluyen colitis colágena, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por derivación, síndrome de Behçet, colitis infecciosa y colitis indeterminada. Muchos de estos trastornos pueden presentar los síntomas de dolor abdominal, vómitos, diarrea, hematoquecia (sangre roja brillante en las heces), pérdida de peso y diversas quejas o enfermedades asociadas como artritis, pioderma gangrenosa y colangitis esclerosante primaria. El diagnóstico se establece generalmente por colonoscopia con biopsia de lesiones patológicas. Los estudios han referido que citocinas como IL-6, IL-1 y TNF- α desempeñan un papel central en la modulación del sistema inmunitario intestinal y que las concentraciones mucosas y sistémicas de muchas citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en EII son elevadas (Rogler, G., y Andus, T. World J. Surg. 22(4):382-9, 1998). Los estudios han mostrado también niveles elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en pacientes con Crohn y que las concentraciones de IL-1 β e IL-6 en el líquido sobrenadante de cultivos de biopsia están correlacionadas positivamente con el grado de afectación tisular medido por gradación endoscópica e histológica (Reimund, J., y col. Gut. 39:684-689, 1996).

Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP)

La enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) se refiere a la inflamación del útero en la mujer, las trompas de Falopio y/o los ovarios a medida que evoluciona para formar cicatrices con adherencia en los tejidos y órganos cercanos. La EIP puede producir necrosis tisular y formación de abscesos. Los estudios han referido que IL-1 β , IL-6 y TNF- α están significativamente elevadas en los pacientes con EIP antes del tratamiento antibiótico (comparado con después del tratamiento) y que estas citocinas pueden desempeñar un papel importante en la patogenia de EIP (Lee, S. A., y col. Clin. Chem. Lab. Med. 46(7):997-1003, 2008).

Lesión por reperfusión

La lesión por reperfusión se refiere a un daño en el tejido causado cuando el riego sanguíneo retorna al tejido después de un periodo de isquemia. La ausencia de oxígeno y nutrientes en la sangre crea una situación en la que restaurar la circulación produce inflamación y daño oxidativo a través de la inducción de estrés oxidativo en lugar de restaurar la función normal. Los estudios han referido que IL-6 impide la lesión por isquemia/reperfusión del hígado a través de la regulación descendente de TNF- α (Camargo, C., y col. Hepatology. 26(6): 1513-1520, 2003). Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, niveles elevados de glóbulos blancos, apoptosis y acumulación de radicales libres.

Artritis reumatoide (AR)

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunitario sistémico crónico que provoca principalmente inflamación y daño en los tejidos en las articulaciones (artritis) y las vainas tendinosas, junto con anemia. La AR también puede producir inflamación difusa en los pulmones, el pericardio, la pleura y la esclerótica del ojo, y también lesiones nodulares, comunes sobre todo en el tejido subcutáneo bajo la piel. La AR puede ser una enfermedad discapacitante y dolorosa, que puede conducir a una pérdida sustancial de funcionamiento y movilidad. Los estudios han referido que los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α están elevados en el suero de pacientes de AR y artritis juvenil (Ziolkowska, M., y col. J. Immunol. 164:2832-2838, 2000). Los síntomas de AR pueden manifestarse en las articulaciones (tumefacción, dolor, hipersensibilidad, una sensación de calor localizado, rigidez y restricción del movimiento); la piel (nódulo reumatoide); los pulmones (fibrosis, síndrome de Caplan, derrames pleurales); los riñones (amiloidosis); el corazón y los vasos sanguíneos (ateroesclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular); y los ojos (epiescleritis, queratoconjuntivitis seca).

Vasculitis

"Vasculitis" se refiere a un trastorno caracterizado por la destrucción inflamatoria de los vasos sanguíneos (arterias y venas). Los estudios han referido que TNF- α , IL-1, e IL-6 son dianas biológicas potenciales del tratamiento de la vasculitis sistémica (Levine, S. M., y Stone, J.H. Best Prac. Res. Clin. Rheumatol. 15(2):315-333, 2001). Los

síntomas de vasculitis normalmente son sistémicos con disfunción de un órgano o multiorgánica. Estos síntomas pueden incluir fatiga, debilidad, fiebre, artralgias, dolor abdominal, hipertensión, insuficiencia renal y disfunción neurológica. Los síntomas adicionales pueden incluir mononeuritis múltiple, púrpura palpable (placas de púrpura en la piel) y síndrome pulmonar-renal. La vasculitis de hipersensibilidad (VHS) es una vasculitis secundaria debida a una respuesta inmunitaria a sustancias exógenas. Los estudios han referido que los valores séricos de IL-6 y TNF- α son significativamente superiores en pacientes con VHS activa que en un grupo de control sano (Nalbant, S., y col. *Rheumatol. Int.* 22(6):244-248, 2002).

5. Trastornos: fibrosis

La fibrosis es la formación o desarrollo de un exceso de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de la lesión o inflamación de una parte, o de la interferencia con su riego sanguíneo. Puede ser consecuencia de la respuesta normal de curación que produce una cicatriz, o ser un proceso reactivo anómalo.

Existen varios tipos de fibrosis que incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística del páncreas y los pulmones, fibrosis en el punto de inyección, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal y fibrosis nefrógena sistémica.

La fibrosis quística (FQ, mucovidiosis, mucoviscidosis) es un trastorno autosómico recesivo hereditario. Es uno de los trastornos genéticos mortales más comunes en los Estados Unidos, que afecta aproximadamente a 30.000 personas, y es prevalente sobre todo en la población blanca; ocurre en uno de cada 3.300 nacidos vivos. El gen implicado en la fibrosis quística, que fue identificado en 1989, codifica una proteína llamada regulador de conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). El CFTR se expresa normalmente por los epitelios exocrinos en todo el cuerpo y regula el movimiento de iones cloruro, iones bicarbonato y glutatión hacia y desde las células. En los pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en el gen CFTR conducen a alteraciones o pérdida total de la función de la proteína CFTR, para producir defectos en la osmolaridad, el pH y las propiedades redox de las secreciones exocrinas. En los pulmones, la FQ se manifiesta por la presencia de una secreción mucosa espesa que obstruye las vías respiratorias. En otros órganos exocrinos, como las glándulas sudoríparas, la FQ no puede manifestarse por un fenotipo obstructivo, sino por la composición anómala de sales de las secreciones (de aquí la prueba clínica de osmolalidad del sudor para detectar pacientes con FQ). La causa predominante de la dolencia y la muerte en los pacientes con fibrosis quística es una enfermedad pulmonar progresiva. El grosor del moco en FQ, que bloquea los pasos de las vías respiratorias, procede según se cree de anomalías en la osmolaridad de las secreciones, así como de la presencia de cantidades masivas de ADN, actina, proteasas y enzimas prooxidativas que se originan en un subconjunto de células inflamatorias, llamadas neutrófilos. De hecho, la enfermedad pulmonar de la FQ se caracteriza por reacciones inflamatorias tempranas e hiperactivas mediadas por neutrófilos a los patógenos víricos y bacterianos. El síndrome hiperinflamatorio de los pulmones con FQ tiene varios hechos de interés especial, entre los cuales se ha descrito un desequilibrio entre quimiocinas proinflamatorias, principalmente IL-8, y citocinas antiinflamatorias, principalmente IL-10, que desempeña un papel importante. Véase Chmiel y col. *Clin Rev Allergy Immunol.* 3(1):5-27 (2002). Los estudios han referido que los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-1 β eran superiores en el líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis quística que en el líquido de lavado broncoalveolar de controles sanos (Bondfield, T.L., y col. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 152(1):2111-2118, 1995).

La fibrosis en el punto de inyección (FI) es una complicación de las inyecciones intramusculares que se produce a menudo en los músculos cuádriceps, tríceps y glúteo de los lactantes y los niños en la cual sujetos son incapaces de flexionar totalmente el músculo afectado. Normalmente es indolora, pero progresiva. Los estudios han referido que la glucoproteína osteopontina (OPN) desempeña un papel en la remodelación del tejido (Liaw, L., y col. *J. Clin. Invest.* 101(7):1469-1478, 1998) y que este mediador proinflamatorio induce regulación por aumento de IL-1 β en los monocitos humanos y una protección mejorada acompañante de TNF- α e IL-6 (Naldini, A., y col. *J. Immunol.* 177:4267-4270, 2006; Weber, G.F., y Cantor, H. *Cytokine Growth Factor Reviews.* 7(3):241-248, 1996).

La enfermedad endomiocárdica (síndrome hipereosinofílico (SH)) es un proceso patológico caracterizado por un recuento persistentemente elevado de eosinófilos (≥ 1.500 eosinófilos/mm 3) en la sangre. El SH afecta simultáneamente a muchos órganos. Los estudios han referido que IL-1 β , IL-6 y TNF- α están expresados en altos niveles en pacientes con miocarditis inducida por virus (Satoh, M., y col. *Virchows Archiv.* 427(5):503-509, 1996). Los síntomas pueden incluir cardiomiopatía, lesiones cutáneas, enfermedad tromboembólica, enfermedad pulmonar, neuropatía, hepatoesplenomegalia (hipertrofia coincidente del hígado y el bazo) y reducción del tamaño de los ventriculares. El tratamiento puede incluir el uso de corticoesteroides para reducir los niveles de eosinófilos.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI, alveolitis fibrosante criptógena) es una enfermedad pulmonar intersticial progresiva crónica de causa desconocida. Se asocia con un patrón histológico de neumonía intersticial habitual y puede caracterizarse por un depósito anómalo y excesivo de tejido fibrótico en el intersticio pulmonar con inflamación asociada mínima. Los estudios han referido aumentos significativos en liberación de TNF- α e IL-6 en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (Zhang, Y., y col. *J. Immunol.* 150(9):4188-4196, 1993), que se ha atribuido al nivel de expresión de IL-1 β (Kolb, M., y col. *J. Clin. Invest.* 107(12): 1529-1536, 2001). Los síntomas incluyen disnea (dificultad para respirar), pero también incluyen tos improductiva, hipocratismo digital (una desfiguración de los dedos de las manos) y crepitaciones (sonidos crepitantes en los pulmones durante la inhalación).

La fibrosis mediastínica (FM) se caracteriza por fibrosis calcificada invasiva centrada en los ganglios linfáticos que bloquea los grandes vasos y las vías respiratorias. La FM es una complicación tardía de la histoplasmosis. Los estudios en modelos murinos de fibrosis han descrito que los valores de IL-1 β y TNF- α están elevados significativamente (Ebrahimi, B., y col. Am. J. Pathol. 158:2117-2125, 2001).

5 La mielofibrosis (metaplasia mieloide, mielofibrosis idiopática crónica, mielofibrosis primaria) es un trastorno de la médula ósea en el que la médula experimenta fibrosis. La mielofibrosis conduce a una insuficiencia progresiva de la médula ósea. La supervivencia media es de cinco años y las causas de muerte incluyen infección, hemorragia, insuficiencia orgánica, hipertensión portal y transformación leucémica. Se ha descrito que los niveles de TNF- α e IL-6 están elevados en los modelos animales de mielofibrosis inducida por virus (Bousse-Kerdiles, M., y col. Ann. Hematol. 78:434-444, 1999).

10 15 La fibrosis retroperitoneal (enfermedad de Ormond) es una enfermedad que caracteriza la proliferación de tejido fibroso en el retroperitoneo. El retroperitoneo es el compartimento del cuerpo que contiene los riñones, la aorta, el tracto renal y otras estructuras. Se ha descrito que IL-1, IL-6 y TNF- α tienen papeles clave en la patogenia de la fibrosis retroperitoneal (Demko, T., y col. J. Am. Soc. Nephrol. 8:684-688, 1997). Los síntomas de fibrosis retroperitoneal pueden incluir, pero no se limitan a, dolor lumbar, insuficiencia renal, hipertensión y trombosis venosa profunda.

20 25 La fibrosis sistémica nefrógena (FSN, dermopatía fibrosante nefrógena) implica fibrosis de la piel, las articulaciones, los ojos y los órganos internos. La FSN puede estar asociada con exposición a gadolinio. Los pacientes desarrollan grandes áreas de piel endurecida con nódulos fibróticos y placas. También pueden producirse contracturas por flexión con una limitación acompañante de la amplitud de movimiento. La FSN muestra una proliferación de fibroblastos dérmicos y células dendríticas, fascículos de colágeno engrosados, aumento de fibras elásticas y depósitos de mucina. Algunos informes han sugerido que un estado proinflamatorio proporciona un factor de predisposición para causar fibrosis nefrógena sistémica (Saxena, S., y col. Int. Urol. Nephrol. 40:715-724, 2008), y que el nivel de TNF- α es elevado en los modelos animales de fibrosis nefrógena sistémica (Steger-Hartmann, T., y col. Exper. Tox. Pathol. 61(6):537-552, 2009).

6. Trastornos: disfunción de las células epiteliales

30 La disfunción de las células epiteliales (disfunción endotelial) se refiere a una disfunción fisiológica de los procesos bioquímicos normales realizados por el endotelio, como la mediación en la coagulación, la adhesión de plaquetas, la función inmunitaria y el control del volumen y el contenido de electrolitos de los espacios intravascular y extravascular. La disfunción endotelial puede proceder de procesos patológicos, como, por ejemplo, shock séptico, hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes así como por factores ambientales, como los productos del tabaco. Los estudios han referido que bajo la influencia de las citocinas, como IL-6, IL-1 β y TNF- α , la dilatación dependiente del endotelio puede degradarse y el endotelio puede perder su capacidad de responder a las hormonas circulantes o autacoides. Este efecto puede favorecer una predisposición a espasmo de los vasos, trombosis o aterogenia (Vila, E. y Salaices, M. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288:H1016-H1021, 2005). Además, los estudios han sugerido que la sobreexpresión de IL-6, regulada por IL-1 β y TNF- α , tiene un papel importante en la disfunción de las células epiteliales (Kornman, K. y col. J. Perio. Res. 34(7):353-357 (2006); Libby, P., y col. Circulation. 86 (6 Suppl): III47-52 (1992)).

40 45 La disfunción endotelial puede caracterizarse por la incapacidad de las arterias y arteriolas de dilatarse completamente en respuesta a un estímulo apropiado. Por ejemplo, las células endoteliales disfuncionales (que tienen vasodilatación reducida) son incapaces de producir óxido nítrico (NO) en la misma medida que las células endoteliales sanas. Esta diferencia es detectable por una diversidad de métodos que incluyen iontoporesis de acetilcolina, administración intraarterial de diversos agentes vasoactivos, calentamiento localizado de la piel y oclusión de la arterial temporal inflando un manguito de presión arterial a altas presiones. También pueden realizarse pruebas en las arterias coronarias en sí, aunque este procedimiento invasivo normalmente no se lleva a cabo salvo que exista una razón clínica para el cateterismo intracoronario. Según se cree, estas técnicas estimulan al endotelio para liberar NO que se difunde en el músculo liso vascular circundante y causa vasodilatación.

50 Los sistemas que permiten el suministro de productos terapéuticos de péptidos y proteínas recombinantes biológicamente activas han sido objeto de numerosos estudios. Los sistemas para el suministro localizado de agentes terapéuticos permiten que los efectos biológicos de dichos agentes alcancen mayor eficacia.

Persisten los retos para suministrar proteínas recombinantes a dianas deseadas *in vivo*. A pesar de los desarrollos en el área de los péptidos de transducción de proteínas, los métodos de suministro clásicos de genes que codifican proteínas por medio de virus adenoasociados, adenovirus, lentivirus, vectores del virus del herpes y vectores de expresión de plásmidos siguen siendo la opción preferida para la expresión de proteínas.

55 La expresión génica mediada por vectores víricos se considera el enfoque más eficaz y fiable para expresar proteínas funcionales *de novo* en tipos celulares mitóticamente activos o bloqueados posmitóticamente debido a la capacidad natural de dichos vectores de suministrar los genes específicos a células permisivas. No obstante, los vectores víricos se requieren invariablemente en grandes dosis para alcanzar niveles de expresión terapéuticos de

las proteínas pretendidas. Por otra parte, los vectores víricos pueden integrarse con el material de cromatina del hospedador. Estas propiedades ejercen efectos a largo plazo en los sistemas genéticos del hospedador, y por tanto, la seguridad sigue siendo una preocupación seria de cara a su aplicación clínica definitiva.

Un enfoque alternativo más seguro consiste en producir proteínas recombinantes de forma exógena y después suministrarlas sistémicamente o mediante inyecciones localizadas en los órganos diana. Sin embargo, el suministro y la biodisponibilidad de proteínas recombinantes en células o tejidos necesitan mejoras adicionales. Aunque varios estudios han sugerido el potencial de los PTD en el descubrimiento de fármacos y la transducción de proteínas de hasta 120 kDa en diferentes células, aún quedan sin resolver cuestiones relativas a la potencia de la transducción de proteínas de fusión mediada por PTD. De hecho, algunos estudios han mostrado fallos en la transducción de proteínas de fusión mediada por PTD *in vitro/in vivo* así como una incapacidad para inducir una respuesta inmunitaria. Además, algunos estudios han mostrado que la expresión intracelular de las proteínas de fusión de PTD u otras proteínas no secretoras no puede conseguir la misma biodistribución que la proteína recombinante, y la entrada de PTD a través de la barrera hematoencefálica sigue siendo elusiva.

La invención descrita proporciona péptidos inhibidores terapéuticos para la inhibición de cinasas, los usos de una clase de péptidos que incluyen dominios terapéuticos y dominios de transducción de proteínas como inhibidores de la actividad de cinasas y los usos de PTD como agentes terapéuticos para diversos trastornos.

Compendio

La invención descrita proporciona composiciones de inhibición de cinasa que contienen una cantidad terapéutica de un péptido inhibidor terapéutico que inhibe al menos una enzima cinasa, para tratar un trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión de citocinas inflamatorias y para tratar un trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión de citocinas inflamatorias usando las composiciones de inhibición de cinasa.

Según un aspecto, la invención descrita proporciona una composición inhibidora de cinasa para tratar un trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende expresión inflamatoria de citocinas, comprendiendo la composición (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor terapéutico, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico inhibe al menos una enzima cinasa, en donde el péptido inhibidor terapéutico comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio comprende un dominio de transducción de proteína y está situado proximal al segundo dominio, en donde el segundo dominio comprende un dominio terapéutico y está situado proximal al primer dominio, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición reduce directa o indirectamente la expresión de al menos una citocina inflamatoria. Según un aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos YARRAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 71]. Según otro aspecto, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13]. Según otro aspecto, el dominio de transducción del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKA [SEQ ID NO: 31]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 43]. Según la invención, el dominio de transducción del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44]. Según la invención, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. Según otra realización, la enzima cinasa es una proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos. Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos 2. Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos 3. Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Según otra realización, el trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión de citocinas inflamatorias es al menos un trastorno seleccionado del grupo que consiste en asma, espondilitis anquilosante, diabetes tipo I, síndrome de Guillain-Barré, lupus, psoriasis, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, vasculitis, vasculitis de hipersensibilidad, shock endotóxico, pancreatitis, enfermedad inflamatoria localizada, ateroesclerosis, enfermedad de Alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenosis, reestenosis, leiomioma, espasmo del músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, bradicardia, hipertensión, hipertrofia cardíaca, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, hipertensión pulmonar, toxemia del embarazo, enfermedad de Raynaud, uremia hemolítica, fisura anal, acalasia, impotencia, migraña, vasculopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardio aturrido, disfunción diastólica, glosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteopenia, artritis degenerativa, septicemia, cirrosis, fibrosis intersticial, colitis, apendicitis, gastritis, laringitis, meningitis, otitis, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, síndrome cardiometabólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística del páncreas y los pulmones, fibrosis en el punto de inyección, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis nefrótica sistémica, cáncer de mama, cáncer de próstata y disfunción de las células epiteliales. Según otra realización, la al menos una

citocina inflamatoria es al menos una de IL-6 y TNF α . Según otra realización, la composición está dispuesta sobre o en el interior de un dispositivo biomédico.

Según otro aspecto, la invención descrita proporciona medios para tratar un trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión inflamatoria de citocinas, comprendiendo el método las etapas de (a) el suministro de una composición inhibidora de cinasa, en donde la composición inhibidora de cinasa comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor terapéutico, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico inhibe al menos una enzima cinasa, en donde el péptido inhibidor terapéutico comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio comprende un dominio de transducción de proteína situado proximal al segundo dominio, en donde el segundo dominio comprende un dominio terapéutico situado proximal al primer dominio, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; (b) la administración de la composición inhibidora de cinasa a un sujeto necesitado de la misma, inhibiendo así al menos una enzima cinasa; y (c) la reducción de la expresión de al menos una citocina inflamatoria, tratando así el trastorno. Según un aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos YARRAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 71]. Según otro aspecto, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRIKA [SEQ ID NO: 31]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 43]. Según la invención, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. Según otro aspecto, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44]. Según la invención, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. Según otra realización, la enzima cinasa es una proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos. Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos 2. Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos 3. Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina. Según otra realización, el trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión de citocinas inflamatorias es al menos un trastorno seleccionado del grupo que consiste en asma, espondilitis anquilosante, diabetes tipo I, síndrome de Guillain-Barré, lupus, psoriasis, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, vasculitis, vasculitis de hipersensibilidad, shock endotóxico, pancreatitis, enfermedad inflamatoria localizada, ateroesclerosis, enfermedad de Alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenosis, reestenosis, leiomioma, espasmo del músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, bradicardia, hipertensión, hipertrofia cardíaca, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, hipertensión pulmonar, toxemia del embarazo, enfermedad de Raynaud, uremia hemolítica, fisura anal, acalasia, impotencia, migraña, vasculopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardio aturrido, disfunción diastólica, glosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteopenia, artritis degenerativa, septicemia, cirrosis, fibrosis intersticial, colitis, apendicitis, gastritis, laringitis, meningitis, otitis, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, síndrome cardiometabólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística del páncreas y los pulmones, fibrosis en el punto de inyección, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis nefrógena sistémica, cáncer de mama, cáncer de próstata, y disfunción de las células epiteliales. Según otra realización, la etapa de administración (a) se realiza mediante la implantación de un dispositivo biomédico, en donde la composición está dispuesta sobre o en el interior del dispositivo. Según otra realización, la etapa de administración (a) es por vía parenteral.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra una representación gráfica de la actividad (% con respecto al control) frente a la concentración de péptido inhibidor (μ M). La Fig. 1 describe las SEQ ID NO: 5, 30, 67-70 y 16, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 2** muestra una representación gráfica de la actividad (% con respecto al control) frente a la concentración de péptido inhibidor (μ M). La Fig. 2 describe las SEQ ID NO: 14, 12, 15, 11 y 16, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 3** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) frente a la concentración de péptido inhibidor MK2 (μ M). UFR/s = unidades de fluorescencia relativa por segundo. La Fig. 3 describe las SEQ ID NO: 22-28 y 13, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 4** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) frente a la concentración de péptido inhibidor MK2 (μ). UFR/s = unidades de fluorescencia relativa por segundo. La Fig. 4 describe 'KALNRQLGVAA' como SEQ ID NO: 13.

La **Figura 5** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) frente a la concentración de péptido inhibidor MK2 (μ M). UFR/s = unidades de fluorescencia relativa por segundo. La Fig. 5 describe las SEQ ID NO: 29-30, 14 y 13, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 6** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) frente a la concentración de péptido inhibidor MK2 (μ M). UFR/s = unidades de fluorescencia relativa por segundo. La Fig. 6 describe las SEQ ID NO: 32, 31, 33, 5 y 13, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 7** muestra una representación gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml/ 10^5 células) con respecto al tiempo. YARA = YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]. † significativamente mayor que 1 ng/mL de muestras tratadas con IL-1 β . * = significativamente menor que 1 ng/mL de muestras tratadas con IL-1 β . Las barras de error representan la desviación típica entre tres muestras.

La **Figura 8** muestra una representación gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml/ 10^5 células) con respecto al tiempo. YARA = YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]; FAK = FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. * = significativamente menor que 1 ng/mL de muestras tratadas con TNF- α . Las barras de error representan la desviación típica entre tres muestras.

La **Figura 9** muestra una representación gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml/ 10^5 células) con respecto al tiempo. YARA = YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]; FAK = FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. * = significativamente menor que 10 ng/mL de muestras tratadas con TNF- α . Las barras de error representan la desviación típica entre tres muestras.

La **Figura 10** muestra una gráfica de la concentración media de IL-1 β (pg/ml) de cada grupo de tratamiento (i) MK2i 1 mM (péptido inhibidor terapéutico YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]) con TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i 3 mM con TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i 1 mM con TNF- α (10 ng/ml); y (iv) MK2i 3 mM con TNF- α (10 ng/ml).

La **Figura 11** muestra una gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml) de cada grupo de tratamiento (i) control negativo (media sólo); (ii) TNF- α (5 ng/ml); (iii) TNF- α (10 ng/ml); (iv) TNF- α (5 ng/l) y MK2i (1 mM péptido inhibidor terapéutico YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]); (v) TNF- α (10 ng/ml) y MK2i (1 mM); (vi) TNF- α (5 ng/ml) y MK2i (3 mM); y (vii) TNF- α (10 ng/ml) y MK2i (3 mM).

Descripción detallada

La invención descrita proporciona composiciones terapéuticas de inhibición de cinasa y métodos útiles para inhibir la proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos.

Glosario

Las abreviaturas usadas en la presente memoria para aminoácidos son las abreviaturas que se usan convencionalmente: A=Ala=Alanina; R=Arg=Arginina; N=Asn=Asparagina; D=Asp=Ácido aspártico; C=Cys=Cisteína; Q=Gln=Glutamina; E=Glu=Ácido glutámico; G=Gly=Glicina; H=His=Histidina; I=Ile=Isoleucina; L=Leu=Leucina; K=Lys=Lisina; M=Met=Metionina; F=Phe=Fenilalanina; P=Pro=Prolina; S=Ser=Serina; T=Thr=Treonina; W=Trp=Triptófano; Y=Tyr=Tirosina; V=Val=Valina. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos L o D. Un aminoácido puede estar sustituido por un aminoácido sintético que es alterado de manera que aumente la semivida del péptido o que aumente la potencia del péptido, o que aumente la biodisponibilidad del péptido.

El término "administrar" como se usa en la presente memoria se refiere a dispensar, suministrar, aplicar, dar, proporcionar o contribuir. Los términos "administrando" o "administración" se usan de forma intercambiable e incluyen la administración *in vivo*, así como la administración directamente a tejido *ex vivo*. En general, las composiciones pueden administrarse sistémicamente por vía oral, bucal, parenteral, tópica, por inhalación o insuflación (es decir, a través de la boca o a través de la nariz), o por vía rectal en formulaciones de unidad de dosificación que contienen los vehículos farmacéuticamente aceptables, adyuvantes y soportes no tóxicos convencionales según se deseé, o pueden administrarse localmente por medios que incluyen, pero no se limitan a, inyección, implantación, injerto, aplicación tópica o parenteralmente. El término "parenteral" como se usa en la presente memoria se refiere a la introducción en el cuerpo por medio de una inyección (es decir, la administración por inyección), lo que incluye, por ejemplo, por vía subcutánea (es decir, una inyección debajo de la piel), intramuscular (es decir, una inyección en un músculo), intravenosa (es decir, una inyección en una vena), intratecal (es decir, una inyección en el espacio alrededor de la médula espinal o bajo la membrana aracnoides del encéfalo), técnicas de infusión o inyección intraesternal. Una composición administrada parenteralmente se suministra usando una aguja, p. ej., una aguja quirúrgica. La expresión "aguja quirúrgica" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier aguja adaptada para el suministro de composiciones fluidas (es decir, capaces de fluir) en una estructura anatómica seleccionada. Las preparaciones inyectables, como suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados.

La administración adicional puede realizarse, por ejemplo, por vía intravenosa, pericárdica, oral, por implante, por vía transmucosa, transdérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intralinfática, intralesional o

5 epidural. La administración puede realizarse por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces, y/o durante uno o más períodos extendidos. Las expresiones "administración tópica" y "aplicación tópica" como se usan en la presente memoria se usan de forma intercambiable para referirse al suministro de un péptido, el ácido nucleico o un vector que comprende el péptido o el ácido nucleico en una o más superficies de un tejido o célula, incluyendo las superficies epiteliales.

La administración tópica, a diferencia de la administración transdérmica, proporciona generalmente un efecto local y no sistémico. Las expresiones "administración tópica" y "administración transdérmica" como se usan en la presente memoria, salvo que se indique o se deduzca implícitamente lo contrario, se usan de forma intercambiable.

10 El término "asociar" y sus diversas formas gramaticales como se usa en la presente memoria se refiere a unir, conectar o combinar con, ya sea de forma directa, indirecta, activa, inactiva, inerte, no inerte, completa o incompleta.

El término "biocompatible" como se usa en la presente memoria se refiere a no causar de forma clínicamente relevante irritación en el tejido, lesión, reacción tóxica o reacción inmunológica en el tejido vivo basándose en una evaluación clínica del riesgo/beneficio.

15 El término "biodegradable" como se usa en la presente memoria se refiere a un material que se degradará activa o pasivamente con el tiempo por procesos químicos simples, por la acción de las enzimas del organismo o por otros mecanismos similares en el cuerpo humano.

20 El término "vehículo" como se usa en la presente memoria se refiere a un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación que no causa irritación significativa en un organismo y no suprime la actividad biológica y las propiedades de la composición de la invención descrita. Los vehículos deben ser de pureza suficientemente alta y de toxicidad suficientemente baja para hacerlos adecuados para la administración a un sujeto para su tratamiento. El vehículo puede ser inerte, o puede poseer beneficios farmacéuticos, beneficios estéticos o ambos.

25 El término "afección" como se usa en la presente memoria se refiere a una diversidad de estados de salud y se entiende que incluye trastornos o enfermedades causados por cualquier mecanismo o trastorno subyacente, lesión y la promoción de tejidos y órganos sanos.

30 La expresión "puesta en contacto" como se usa en la presente memoria se refiere a llevar o poner en contacto. El término "contacto" como se usa en la presente memoria se refiere a un estado o condición de toque o de proximidad inmediata o local. La puesta en contacto de una composición con un destino diana, que incluye, pero no se limita a, un órgano, tejido, célula o tumor, puede ocurrir por cualquier medio de administración conocido para el experto en la técnica.

35 La expresión "elemento regulador controlable" como se usa en la presente memoria se refiere a secuencias de ácidos nucleicos capaces de efectuar la expresión de los ácidos nucleicos, o el producto de péptido o proteína de las mismas. Los elementos reguladores controlables pueden estar unidos operativamente a los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas de la presente invención. Los elementos reguladores controlables, que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de control, no tienen que ser contiguos con los ácidos nucleicos, péptidos, o proteínas cuya expresión controlan siempre y cuando actúen para dirigir la expresión de los mismos. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias no traducidas, aunque transcritas, interpuestas entre una secuencia promotora y un ácido nucleico de la presente invención y la secuencia promotora aún puede considerarse "ligada operativamente" a la secuencia codificante. Otras de estas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, señales de poliadenilación, señales de terminación y sitios de unión a ribosomas.

40 La expresión "liberación controlada" pretende referirse a cualquier formulación que contiene un fármaco en la que la manera y el perfil de liberación del fármaco a partir de la formulación están controlados. Se refiere tanto a formulaciones de liberación inmediata como no inmediata, en donde las formulaciones de liberación no inmediata incluyen, pero no se limitan a, formulaciones de liberación sostenida y de liberación retardada.

45 El término "citocina" como se usa en la presente memoria se refiere a pequeñas sustancias de proteínas solubles secretadas por células que tienen diversos efectos en otras células. Las citocinas son mediadoras en muchas funciones fisiológicas importantes que incluyen el crecimiento, el desarrollo, la cicatrización de heridas y la respuesta inmunitaria. Actúan uniéndose a sus receptores específicos de células situados en la membrana celular, que permite una cascada de transducción de señal distinta para su inicio en la célula, que finalmente conducirá a cambios bioquímicos y fenotípicos en las células diana. En general, las citocinas actúan localmente. Incluyen citocinas de tipo I, que comprenden muchas de las interleucinas, así como varios factores de crecimiento hematopoyéticos; citocinas de tipo II, que incluyen los interferones y la interleucina-10; moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral ("TNF"), que incluyen TNF α y linfotoxina; miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, que incluyen la interleucina 1 ("IL-1"); y las quimiocinas, una familia de moléculas que desempeñan un papel fundamental en una amplia variedad de funciones inmunitarias e inflamatorias. La misma citocina puede tener diferentes efectos en una célula dependiendo del estado de la célula. Las citocinas a menudo regulan la expresión, y activan cascadas, de otras citocinas.

La expresión "liberación retardada" se usa en la presente memoria en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco en la que existe un retardo de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco desde la misma. La "liberación retardada" puede implicar o no una liberación gradual del fármaco durante un periodo de tiempo extendido, y así puede ser o no una "liberación sostenida".

5 El término "enfermedad" o "trastorno" como se usa en la presente memoria generalmente se refiere a un deterioro de la salud o un estado de funcionamiento anómalo. Los trastornos relevantes para la invención descrita pueden incluir, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias, fibrosis, shock endotóxico, pancreatitis, asma, enfermedad inflamatoria localizada, enfermedad cardiovascular ateroesclerótica, enfermedad de Alzheimer, enfermedades oncológicas, isquemia neural, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, hiperplasia íntima, estenosis, reestenosis, ateroesclerosis, tumores de células del músculo liso y metástasis, espasmo del músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, isquemia, bradicardia, hipertensión, hipertrofia cardiaca, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, hipertensión pulmonar, toxemia del embarazo, parto prematuro, preeclampsia, eclampsia, enfermedad o fenómeno de Raynaud, uremia hemolítica, fisura anal, acalasia, impotencia, migraña, lesión muscular isquémica asociada con espasmo del músculo liso, vasculopatía, bradiarritmia, insuficiencia cardiaca congestiva, miocardio aturrido, hipertensión pulmonar, disfunción diastólica, gliosis (que significa proliferación de astrocitos, lo que puede incluir depósito de matriz extracelular (MEC) en áreas dañadas del sistema nervioso central), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (que significa enfermedades del aparato respiratorio caracterizadas por obstrucción o limitación del flujo de aire; incluye pero no se limita a bronquitis crónica y enfisema), osteopenia, disfunción endotelial, inflamación, artritis degenerativa, espondilitis anquilosante, enfermedad de Sjögren, enfermedad de Guillain-Barré, enfermedad infecciosa, septicemia, shock endotoxémico, psoriasis, enteritis por radiación, esclerodermia, cirrosis, fibrosis intersticial, colitis, apendicitis, gastritis, laringitis, meningitis, pancreatitis, otitis, lesión por reperfusión, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, lupus, alergia, enfermedades cardiométabólicas, obesidad, diabetes mellitus tipo II, diabetes mellitus tipo I y EHNA/cirrosis.

25 El término "dominio" como se usa en la presente memoria se refiere a una unidad estructural de una proteína que se pliega más o menos independientemente para formar una estructura compacta globular. El término "fármaco" como se usa en la presente memoria se refiere a un agente terapéutico o cualquier sustancia, distinta de un alimento, usado en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad.

30 El término "hibridación" se refiere a la unión de dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias entre sí a través de emparejamiento de bases. Los nucleótidos se unirán con su complemento en condiciones normales, de manera que dos cadenas perfectamente complementarias se unirán (o 'hibridarán') entre sí con facilidad. Sin embargo, debido a las diferentes geometrías moleculares de los nucleótidos, una única inconsistencia entre las dos cadenas hará la unión entre ellas más desfavorable energéticamente. Los efectos de la incompatibilidad de las bases pueden medirse cuantificando la tasa a la que se hibridan dos cadenas, lo que puede proporcionar información sobre la similitud en la secuencia de bases entre las dos cadenas sometidas a hibridación.

35 El término "hidrogel" como se usa en la presente memoria se refiere a una sustancia que produce una estructura sólida, semisólida, seudoplástica o plástica que contiene un componente acuoso necesario para producir una masa gelatinosa o de tipo gelatina. El hidrogel incorpora y conserva cantidades significativas de H₂O, que finalmente llegarán a un contenido en equilibrio en presencia de un entorno acuoso.

40 El término "hídrico" como se usa en la presente memoria se refiere a un material o sustancia que tiene una afinidad por las sustancias polares, como el agua.

45 Las expresiones "en el cuerpo", "volumen de vacío", "bolsa de resección", "excavación", "sitio de inyección", "sitio de depósito" o "sitio de implante" como se usan en la presente memoria pretenden incluir todos los tejidos del organismo sin límite, y pueden referirse a espacios formados en los mismos a partir de inyecciones, incisiones quirúrgicas, extirpación de tumores o tejidos, lesiones tisulares, formación de abscesos o cualquier otra cavidad, espacio o bolsa similar formada así por la acción de una evaluación clínica, tratamiento o respuesta fisiológica a la enfermedad o patología a modo de ejemplos no limitativos de los mismos.

50 Los términos "inhibiendo", "inhibir" o "inhibición" como se usa en la presente memoria se usan para referirse a la reducción de la cantidad o la velocidad de un proceso, a la detención del proceso completamente o a la disminución, limitación o bloqueo de la acción o función del mismo. La inhibición puede incluir una reducción o descenso de la cantidad, velocidad, acción función o proceso en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % cuando se compara con una sustancia de referencia, en donde la sustancia de referencia es una sustancia que no se inhibe.

55 El término "lesión" como se usa en la presente memoria se refiere a un daño o perjuicio en una estructura o función del cuerpo causado por un agente o fuerza externos, que pueden ser físicos o químicos.

El término "aislado" se refiere a un material, como un ácido nucleico, un péptido o una proteína, que: (1) está

sustancial o esencialmente libre componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él como se encuentra en el entorno presente en la naturaleza. Las expresiones "sustancial o esencialmente libre" se usan para referirse a un material, que está libre al menos en el 80 % de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él como se encuentra en el entorno presente en la naturaleza. El material aislado comprende opcionalmente material no encontrado con el material en su entorno natural; o (2) si el material está en su entorno natural, el material ha sido alterado de forma sintética (no natural) por una intervención humana deliberada en una composición y/o colocado en un lugar en la célula (p. ej., orgánulo del genoma o subcelular) no nativo para un material encontrado en ese entorno. La alteración para producir el material sintético puede realizarse en el material introduciéndolo en, o apartándolo de, su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico presente en la naturaleza se convierte en un ácido nucleico aislado si es alterado, o si se transcribe a partir de ADN que ha sido alterado, por medio de una intervención humana realizada dentro de la célula de la cual se origina. Véase, por ejemplo, Compuestos y métodos para mutagenia dirigida al sitio en células eucarióticas, Kmiec, patente de EE.UU. nº 5.565.350; Direcciónamiento de secuencias homólogas in vivo en células eucarióticas; Zarling y col., documento PCT/US93/03868. De forma similar, un ácido nucleico presente en la naturaleza (por ejemplo, un promotor) queda aislado si se introduce mediante medios no presentes en la naturaleza en un locus del genoma no nativo en ese ácido nucleico. Los ácidos nucleicos que están "aislados" como se define en la presente memoria también se refieren como ácidos nucleicos "heterólogos".

El término "cinasa" como se usa en la presente memoria se refiere a un tipo de enzima que transfiere grupos fosfato a partir de moléculas donadoras de alta energía a moléculas o sustratos diana específicos. Los grupos donadores de alta energía pueden incluir, pero no se limitan a, ATP.

La expresión "actividad de cinasa" como se usa en la presente memoria se refiere una fosforilación mediada por cinasa de un sustrato de cinasa.

La expresión "sustrato de cinasa" como se usa en la presente memoria se refiere a un sustrato que puede ser fosforilado por una cinasa.

El término "lábil" en sus diversas formas gramaticales como se usa en la presente memoria se refiere a ser apto o susceptible de cambio. Un compuesto lábil es aquel capaz de cambiar de estado o de volverse inactivo.

El término "lipófilo" como se usa en la presente memoria se refiere a que prefiere o posee una afinidad por un entorno no polar en comparación con un entorno polar o acuoso.

La expresión "liberación a largo plazo", como se usa en la presente memoria, significa que un implante se construye y se dispone para suministrar niveles terapéuticos de un ingrediente activo durante al menos 7 días, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 días.

La expresión "célula de mamífero" como se usa en la presente memoria se refiere a una célula derivada de un animal de la clase Mammalia. Como se usa en la presente memoria, las células de mamífero pueden incluir células normales, anómalas y transformadas. Los ejemplos de células de mamífero usadas dentro de la invención descrita, incluyen, pero no se limitan a, neuronas, células epiteliales, células musculares, glóbulos sanguíneos, células inmunitarias, células madre, osteocitos, células endoteliales y blastocitos.

El término "modular" como se usa en la presente memoria significa regular, alterar, adaptar o ajustar en una cierta medida o proporción.

El término "normal" se refiere a un patrón, modelo, mediana o media de un grupo grande.

La expresión "sujeto sano normal" se refiere a un sujeto que no tiene síntomas u otras evidencias de un trastorno inflamatorio.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma monocatenaria o bicatenaria, y salvo que esté limitado de otro modo, comprende análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales en los que se hibridan en ácidos nucleicos monocatenarios de una forma similar a los nucleótidos presentes en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos peptídicos).

El término "nucleótido" se refiere a un compuesto químico que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. En los nucleótidos más comunes la base es un derivado de purina o pirimidina, y el azúcar es la pentosa desoxirribosa o ribosa. Los nucleótidos son los monómeros de ácidos nucleicos, con tres o más uniones conjuntas para formar un ácido nucleico. Los nucleótidos son las unidades estructurales de ARN, ADN y varios cofactores, que incluyen, pero no se limitan a, CoA, FAD, DMN, NAD y NADP. Las purinas incluyen adenina (A) y guanina (G); las pirimidinas incluyen citosina (C), timina (T) y uracilo (U).

La frase "ligado operativamente" se refiere a una primera o primeras secuencias o dominios que se colocan suficientemente proximales a una segunda o segundas secuencias o dominios de manera que la primera o primeras secuencias o dominios pueden ejercer influencia en la segunda o segundas secuencias o dominios o una región bajo el control de esa segunda secuencia o dominio.

El término "partículas" como se usa en la presente memoria se refiere a un constituyente extremadamente pequeño (p. ej., nanopartículas, micropartículas, o en algunos casos más grandes) que pueden contener en parte o en su totalidad la composición inhibidora de cinasa como se describe en la presente memoria.

5 El término "péptido" como se usa en la presente memoria se refiere a dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

10 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido presente en la naturaleza correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza. La naturaleza esencial de dichos 15 análogos de aminoácidos presentes en la naturaleza es que, cuando se incorporan en una proteína esa proteína es específicamente reactiva para los anticuerpos que se producen como respuesta para la misma proteína pero que consisten enteramente en aminoácidos presentes en la naturaleza. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también son inclusivos de modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, unión a lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Se observará, como es bien conocido y como se indica anteriormente, que los polipéptidos pueden no ser totalmente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ramificarse como consecuencia de una ubicitinación, y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente como consecuencia de acontecimientos postraduccionales, que incluyen acontecimientos de procesamiento natural y acontecimientos realizados manipulación humana que no tienen lugar de forma natural. Los polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados pueden ser sintetizados por un 20 proceso de traducción no natural y también por métodos totalmente sintéticos.

El término "peptidomimético" como se usa en la presente memoria se refiere a una pequeña cadena de tipo proteína diseñada para emular un péptido. Un peptidomimético procede normalmente de la modificación de un péptido existente con el fin de alterar las propiedades de la molécula.

25 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria se refiere a una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas la para administración a un ser humano u otro animal vertebrado.

30 El término "polímero" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquiera de los diversos compuestos químicos formados por moléculas idénticas más pequeñas (llamadas monómeros) unidas entre sí. Los polímeros tienen generalmente pesos moleculares elevados. El proceso por el cual las moléculas se unen entre sí para formar polímeros se llama "polimerización".

35 El término "polinucleótido" se refiere a un desoxirribopolinucleótido, ribopolinucleótido o análogos de los mismos que tienen la naturaleza esencial de un ribonucleótido natural en el que se hibridan, en condiciones de hibridación estrictas, sustancialmente en la misma secuencia de nucleótidos que los nucleótidos presentes en la naturaleza y/o permiten la traducción en el mismo o los mismos aminoácidos que el o los nucleótidos presentes en la naturaleza. Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una subsecuencia de un gen regulador o estructural nativo o heterólogo. Salvo que se indique lo contrario, el término incluye la referencia a la secuencia especificada así como la secuencia complementaria de la misma. Así, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otros motivos son "polinucleótidos" como se pretende con el término en la presente memoria. Por otra parte, los ADN o los ARN que comprenden bases no habituales, como inosina, o bases modificadas, como bases tritadas, por 40 citar solo dos ejemplos, son polinucleótidos según se usa el término en la presente memoria. Se observará que se ha realizado una gran variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que sirven para numerosos objetivos conocidos por los expertos en la técnica. El término polinucleótido como se emplea en la presente memoria comprende estas formas modificadas de forma química, enzimática o metabólica de polinucleótidos, así como las 45 formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, lo que incluye entre otras cosas, células simples y complejas.

La expresión "secuencia primaria" como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de aminoácidos.

El término "profármaco" como se usa en la presente memoria significa un péptido o derivado, que es en una forma inactiva, y, que se convierte en una forma activa por conversión biológica después de la administración a un sujeto.

50 Las siguientes expresiones se usan en la presente memoria para describir las relaciones de secuencias entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencias", (d) "porcentaje de identidad de secuencias" y (e) "identidad sustancial".

55 La expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia usada como base para comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de un ADNc o secuencia génica de longitud completa, o el ADNc o secuencia génica completa.

La expresión "ventana de comparación" se refiere a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótidos, en donde la secuencia de polinucleótidos puede compararse con una secuencia de referencia y en

donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. En general, la ventana de comparación tiene al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede tener al menos 30 nucleótidos contiguos de longitud, al menos 40 nucleótidos contiguos de longitud, al menos 50 nucleótidos contiguos de longitud, al menos 100 nucleótidos contiguos de longitud, o más. Los expertos en la técnica comprenden que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia de polinucleótidos, normalmente se introduce una penalización de huecos y se resta del número de correspondencias.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación de secuencias óptima para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970); mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988); mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos, que incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., EE.UU.; el programa CLUSTAL ha sido bien descrito por Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet, y col., *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90 (1988); Huang y col., *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-65 (1992), y Pearson, y col., *Methods in Molecular Biology* 24:307-331 (1994). La familia de programas BLAST, que puede usarse para búsquedas de similitudes de bases de datos, incluye: BLASTN para secuencias de búsqueda de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para secuencias de búsqueda de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de proteínas; BLASTP para secuencias de búsqueda de proteínas frente a secuencias de bases de datos de proteínas; TBLASTN para secuencias de búsqueda de proteínas frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para secuencias de búsqueda de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos. Véase *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 19, Ausubel, y col., Eds, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995).

Salvo que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencias proporcionados en la presente memoria se refieren al valor obtenido usando la plataforma de programas BLAST 2.0 usando parámetros por omisión. Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente, p. ej., a través del National Center for Biotechnology-Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que se correspondan con o que satisfagan alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul y col., supra). Estas coincidencias de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas dirigidas a encontrar HSP más largas que las contienen. Las coincidencias de palabras se extienden a continuación en las dos direcciones a lo largo de cada secuencia en el sentido en que pueda incrementarse la puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos de correspondencia; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos sin correspondencia; siempre <0). En las secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuaciones para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X con respecto al valor conseguido máximo; la puntuación acumulada desciende a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores por omisión como una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M=5, N=-4, y una comparación de las dos cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por omisión una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencias, el algoritmo BLAST realiza también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma mínima (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produciría por casualidad. Las búsquedas BLAST suponen que las proteínas pueden modelizarse como secuencias aleatorias. Sin embargo, muchas proteínas reales comprenden regiones de secuencias no aleatorias que pueden ser tracts homopoliméricos, repeticiones de periodo corto o regiones enriquecidas en uno o más aminoácidos. Dichas regiones de baja complejidad pueden alinearse entre proteínas no relacionadas aun cuando otras regiones de la proteína sean totalmente diferentes. Puede emplearse una serie de programas de filtro de baja complejidad para reducir dichas alineaciones de baja complejidad. Por ejemplo, los filtros de baja complejidad SEG (Wooten y Federhen, *Comput. Chem.*, 17:149-163 (1993)) y XNU (Claverie y States, *Comput. Chem.*, 17:191-201 (1993)) pueden emplearse solos o en combinación.

Como se usa en la presente memoria, "identidad de secuencias" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de

áidos nucleicos o polipéptidos se refiere a los residuos en las dos secuencias que son las mismas cuando se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencias se usa en referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticos difieren a menudo por sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, en donde los residuos de aminoácidos son sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobia) y por tanto no modifican las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencias puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencias" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos para los expertos en la técnica, Normalmente implica la puntuación de una sustitución conservadora como una correspondencia parcial en lugar de total, aumentando así el porcentaje de identidad de secuencias. Así, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservadora se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, p. ej., según el algoritmo de Meyers y Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4:11-17 (1988) p. ej., tal como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif., EE.UU.).

Como se usa en la presente memoria, "porcentaje de identidad de secuencias" significa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que la base de ácidos nucleicos o residuo de aminoácidos idénticos aparecen en las dos secuencias para producir el número de posiciones con correspondencia, dividiendo el número de posiciones con correspondencia por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias.

La expresión "identidad sustancial" de secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencias, al menos el 80 % de identidad de secuencias, al menos el 90 % de identidad de secuencias y al menos el 95 % de identidad de secuencias, en comparación con una secuencia de referencia que usa uno de los programas de alineación descritos usando parámetros estándar. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad de proteínas correspondiente codificada por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de secuencias de aminoácidos para estos fines significa normalmente una identidad de secuencias de al menos el 60 %, o al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %. Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones estrictas. Sin embargo, los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones estrictas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto puede ocurrir, p. ej., cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codones máxima permitida por el código genético. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido que codifica el primer ácido nucleico es inmunológicamente interreactivo con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

La expresión "identidad sustancial" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos el 70 % de identidad de secuencias con una secuencia de referencia, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o el 95 % de identidad de secuencias con la secuencia de referencia en una ventana de comparación especificada. Opcionalmente, la alineación óptima se realiza usando el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Una indicación de que dos secuencias peptídicas son sustancialmente idénticas es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos preparados contra el segundo péptido. Así, un péptido es sustancialmente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos se diferencian sólo por una sustitución conservadora. Los péptidos que son "sustancialmente similares" comparten secuencias como se indica anteriormente con la salvedad de que aquellas posiciones de residuos que no son idénticas pueden diferir por cambios de aminoácidos conservadores.

La expresión "dominio de transducción de proteína" (también referido como "PTD", "péptido troyano", "secuencia de translocación de membrana", "proteína permeable celular", "CPP") como se usa en la presente memoria se refiere a una clase de péptidos capaces generalmente de penetrar en la membrana plasmática de células de mamífero. Los PTD tienen generalmente 10-16 aminoácidos de longitud, y son capaces de transportar compuestos de muchos tipos y pesos moleculares a través de células de mamífero. Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a, moléculas efectoras, como proteínas, ADN, péptidos conjugados, oligonucleótidos y partículas pequeñas como liposomas. Cuando los PTD están fusionados o ligados químicamente con otras proteínas para formar proteínas de fusión, estas proteínas de fusión seguirán siendo capaces de penetrar en la membrana plasmática y entrar en las células.

Los términos "reducir" o "reducción" como se usa en la presente memoria se refieren a una disminución o descenso en grado, intensidad, estado, condición o extensión.

La expresión "secuencia reguladora" (también referida como "región reguladora" o "elemento regulador") se refiere a un promotor, intensificador u otro segmento de ADN en donde las proteínas reguladoras, como los factores de transcripción, se unen preferentemente para controlar la expresión génica y con ello la expresión de proteínas.

5 Los términos "sujeto" o "individuo" o "paciente" se usan de forma intercambiable para referirse a un miembro de una especie animal de origen mamífero, que incluye pero no se limita a, un ratón, una rata, un gato, una cabra, una oveja, un caballo, un hámster, un hurón, un ornitorrinco, un cerdo, un perro, una cobaya, un conejo y un primate, como, por ejemplo, un mono, un simio o un ser humano.

10 La expresión "liberación sostenida" (también referida como "liberación extendida") se usa en la presente memoria en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco en un periodo de tiempo extendido, y que preferiblemente, aunque no necesariamente, produce unos niveles en sangre sustancialmente constantes de un fármaco durante un periodo de tiempo extendido.

El término "síntoma" como se usa en la presente memoria se refiere a un signo o un indicio de trastorno o enfermedad, especialmente cuando es experimentado por un individuo como un cambio con respecto a una función, sensación o apariencia normales.

15 El término "síndrome" como se usa en la presente memoria se refiere a un patrón de síntomas indicativos de alguna enfermedad o afección.

20 La expresión "agente terapéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a un fármaco, molécula, ácido nucleico, proteína, metabolito, péptido, composición u otra sustancia que proporciona un efecto terapéutico. El término "activo" como se usa en la presente memoria se refiere al ingrediente, componente o constituyente de las composiciones de la presente invención responsables del efecto terapéutico pretendido. Las expresiones "agente terapéutico" y "agente activo" se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

25 La expresión "componente terapéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a una dosificación terapéuticamente eficaz (es decir, dosis y frecuencia de administración) que elimina, reduce o previene la progresión de una manifestación concreta de una enfermedad en un porcentaje de una población. Un ejemplo de un componente terapéutico usado comúnmente es la DE50 que describe la dosis en una dosificación particular que es terapéuticamente eficaz para una manifestación concreta de una enfermedad en el 50 % de una población.

La expresión "dominio terapéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a un péptido, segmento de péptido o variante o derivado del mismo, con identidad sustancial con el péptido KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13], o un segmento del mismo. Los dominios terapéuticos generalmente no son capaces de penetrar en la membrana plasmática de las células de mamífero y cuando entran en contacto con una enzima cinasa, inhiben la enzima cinasa de manera que la actividad de cinasa de la enzima cinasa se reduce. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 99 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 95 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 90 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 85 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 80 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 75 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 70 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 80 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 75 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 70 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 65 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 60 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 55 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 50 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 45 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 40 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 35 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 30 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 25 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la

enzima cinasa es aproximadamente el 20 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 15 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 10 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 9 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 8 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 7 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 6 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 5 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 4 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 3 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 2 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 1 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 0,1 % de la de una enzima cinasa no inhibida. Un dominio terapéutico puede inhibir una enzima cinasa de manera que la actividad de la enzima cinasa es aproximadamente el 0,01 % de la de una enzima cinasa no inhibida.

La expresión "péptido inhibidor terapéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a un péptido formado por un primer dominio y un segundo dominio. El primer dominio comprende un dominio de transducción de proteína (PTD) y está situado proximal al segundo dominio. El segundo dominio, situado proximal al primer dominio, comprende un dominio terapéutico. El término "proximal" como se usa en la presente memoria se refiere a muy cerca o contiguo, ya sea en el espacio, el tiempo o el orden.

La expresión "efecto terapéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a una consecuencia del tratamiento, cuyos resultados se valoran como deseables y beneficiosos. Un efecto terapéutico puede incluir, directa o indirectamente, la detención, reducción o eliminación de una manifestación patológica. Un efecto terapéutico puede incluir también, directa o indirectamente, la detención, reducción o eliminación de la progresión de una manifestación patológica. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de uno o más de los agentes activos de la presente invención es una cantidad que es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Generalmente, una cantidad eficaz de los agentes activos que puede emplearse según la invención descrita está comprendida entre aproximadamente 0,000001 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, los niveles de dosificación se basan en diversos de factores, que incluyen el tipo de lesión, la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración y el agente activo en particular empleado. Así el régimen posológico puede variar ampliamente, pero puede ser determinado de forma rutinaria por un médico usando métodos estándar.

Existen métodos para la transducción y la transfección de ácidos nucleicos en células. Los términos "transducción", o "transducir" como se usa en la presente memoria se usan de forma intercambiable para referirse al proceso de atravesar membranas biológicas. El cruce de membranas biológicas puede ser de una célula a otra, del entorno extracelular al entorno intracelular, o a través de una membrana celular o membrana nuclear. Los materiales que pueden experimentar transducción incluyen, pero no se limitan a, proteínas, proteínas de fusión, péptidos, polipéptidos, aminoácidos, ADN vírico y ADN bacteriano.

El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente memoria se refiere a cumplir uno o más de lo siguiente: (a) reducir la gravedad de un trastorno; (b) limitar el desarrollo de los síntomas característicos de un trastorno sometido a tratamiento; (c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos de un trastorno sometido a tratamiento; (d) limitar la recurrencia de un trastorno en pacientes que previamente tuvieron el trastorno; y (e) limitar la recurrencia de los síntomas en pacientes que antes tenían síntomas para el trastorno.

El término "variante" y sus diversas formas gramaticales como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos con identidad sustancial con una secuencia de nucleótidos de referencia o una secuencia de aminoácidos de referencia, respectivamente. Las diferencias en las secuencias pueden ser consecuencia de cambios, naturales o por diseño, en secuencia o estructura. Los cambios naturales pueden producirse durante el curso de la replicación o duplicación normal en la naturaleza de una secuencia de ácidos nucleicos en particular. Los cambios diseñados pueden diseñarse e introducirse específicamente en la secuencia para fines concretos. Dichos cambios específicos pueden realizarse *in vitro* usando diversas técnicas de mutagenia. Dichas variantes de secuencias generadas específicamente pueden referirse como "mutantes" o "derivados" de la secuencia original.

Un experto en la técnica puede producir análogamente variantes de polipéptidos que tienen una o varias sustituciones, delecciones, adiciones o reemplazamientos de aminoácidos. Estas variantes pueden incluir entre otros: (a) variantes en las que uno o más residuos de aminoácidos están sustituidos por aminoácidos conservadores o no

5 conservadores; (b) variantes en las que se añaden uno o más aminoácidos; (c) variantes en las que al menos un aminoácido incluye un grupo sustituyente; (d) variantes en las que una proteína diana se fusiona con otro péptido o polipéptido como un compañero de fusión, una marca de proteína u otra fracción química, que puede conferir propiedades útiles a la proteína diana, como, por ejemplo, un epítopo para un anticuerpo. Las técnicas para obtener dichas variantes, que incluyen técnicas genéticas (supresiones, delecciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas son conocidas para el experto en la técnica. Como se usa en la presente memoria, el término "mutación" se refiere a un cambio de la secuencia de ADN dentro de un gen o un cromosoma de un organismo que lleva a la creación de un nuevo carácter o rasgo no presente en el tipo parental, o el proceso por el cual dicho cambio se produce en un cromosoma, ya sea a través de una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN que codifica un gen o a través de un cambio en la configuración física de un cromosoma. Los tres mecanismos de mutación incluyen sustitución (intercambio de un par de bases por otro), adición (inserción de una o más bases en una secuencia) y delección (pérdida de uno o más pares de bases).

10 15 El término "sustitución" se usa en la presente memoria para referirse a aquella base o bases que se intercambian por otra base o bases en el ADN. Las sustituciones pueden ser sustituciones sinónimas o sustituciones no sinónimas. Como se usa en la presente memoria, "sustituciones sinónimas" se refiere a sustituciones de una base por otra en un exón de un gen que codifica una proteína, de manera que la secuencia de aminoácidos producida no se modifica. La expresión "sustituciones no sinónimas" como se usa en la presente memoria se refiere a sustituciones de una base por otra en un exón de un gen que codifica una proteína, de manera que la secuencia de aminoácidos producida se modifica.

20 25 El término "delección" y la expresión "mutación de delección" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a aquella base o bases que se pierden del ADN.

El término "adición" como se usa en la presente memoria se refiere a la inserción de una o más bases, o de uno o más aminoácidos, en una secuencia.

30 35 A continuación se representan grupos de aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Ácido glutámico (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Composiciones: inhibidores de péptidos de cinasa terapéuticos

Según un aspecto, la invención descrita proporciona una composición inhibidora de cinasas para tratar un trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión inflamatoria de citocinas, comprendiendo la composición

30 35 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor terapéutico, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico inhibe al menos una enzima cinasa, en donde el péptido inhibidor terapéutico comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio comprende un dominio de transducción de proteína (PTD) y está situado proximal al segundo dominio, en donde el segundo dominio, situado proximal al primer dominio, comprende un dominio terapéutico, en donde la composición reduce directa o indirectamente la expresión de al menos una citocina inflamatoria. Según una realización, el primer dominio está situado en posición 5' con el segundo dominio. Según otra realización, el segundo dominio está situado en posición 3' con el primer dominio.

40 45 50 55 Según una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 0,000001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 0,00001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico es de una cantidad de

En un aspecto de la descripción, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14]. Según la presente invención, el péptido inhibidor terapéutico de la invención es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. Según otra realización, el péptido inhibidor terapéutico de la invención es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. También se describe un péptido inhibidor terapéutico que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] o YARAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 16] o YARAARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17] o YARAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18] o YARAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19] o YARAARGQRAKALNRQLGVA [SEQ ID NO: 20] o YARAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

En un aspecto de la descripción, el dominio terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13] o KAANRQLGVAA [SEQ ID NO: 22]. Según una realización, el dominio terapéutico de la invención es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos KALARQLGVAA [SEQ ID NO: 23] o KALNAQLGVAA [SEQ ID NO: 24] o KALNRALGVAA [SEQ ID NO: 25] o KALNRQAGVAA [SEQ ID NO: 26] o KALNRQLAVAA [SEQ ID NO: 27] o KALNRQLGAAA [SEQ ID NO: 28] o KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 29] o KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30].

En un aspecto de la descripción, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKA [SEQ ID NO: 31] o WLRRRIKA [SEQ ID NO: 32] o YARAARQARA [SEQ ID NO: 5]. Según otro aspecto, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRQR [SEQ ID NO: 33] o WLRRRIKAWLRRRI [SEQ ID NO: 34]. Según la invención, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos

FAKLAARLYR [SEQ ID NO: 35]. Según otra realización, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYR [SEQ ID NO: 36]. Según otro aspecto, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 43] o KAFAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44].

5 Según otra realización, el primer dominio está situado en posición 5' con el segundo dominio. Según otra realización, el segundo dominio está situado en posición 3' con el primer dominio. Según otra realización, el primer dominio está ligado operativamente con el segundo dominio. Según otra realización, el segundo dominio está ligado operativamente con el primer dominio.

10 Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos. Según algunas de dichas realizaciones, la enzima cinasa es MK2. Según algunas de dichas realizaciones, la enzima cinasa es MK3. Según otra realización, la enzima cinasa es CaMK.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es fibrosis.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es disfunción de las células epiteliales.

15 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es shock endotóxico. El shock endotóxico (shock séptico) es una afección en la que el sistema circulatorio es incapaz de proporcionar una circulación adecuada a los tejidos del cuerpo debido a la presencia de una sustancia inflamatoria. Los estudios han referido que los niveles séricos de TNF- α determinan el curso fatal o no fatal de shock endotóxico (Mozes, T., y col. Immunol. Lett. 27(2): 157-62, 1991), mientras que los niveles de IL-6 en pacientes con shock séptico están elevados significativamente (Waage, A., y col. J. Exp. Med. 169:333-338, 1989). Los síntomas de shock endotóxico incluyen, pero no se limitan a, fiebre baja, ausencia de apetito, depresión mental y física leve, aumento de la frecuencia cardiaca, baja presión de pulso, deshidratación y diarrea.

25 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es pancreatitis. La pancreatitis es la inflamación del páncreas. La pancreatitis aguda es súbita mientras que la pancreatitis crónica se caracteriza por dolor abdominal recurrente o persistente con o sin esteatorrea o diabetes mellitus. Existen evidencias considerables de que las citocinas proinflamatorias (p. ej., TNF- α , IL-1 β) desempeñan un papel central en la fisiopatología de la pancreatitis aguda y pueden mediar en la complicación sistémica de la pancreatitis aguda al actuar como mediadores proximales, que inducen la producción de otros mediadores que incluyen IL-6 e IL-8. IL-1 β y TNF- α se han implicado como agentes que conducen a la progresión de la enfermedad e IL-6 e IL-8 como indicadores de gravedad (Pooran, N., y col. J. Clin. Gastroenterol. 37(3):263-266, 2003). Los síntomas de pancreatitis incluyen, pero no se limitan a, dolor abdominal superior intenso, con irradiación a la espalda, náuseas, vómitos, fluctuaciones en la presión arterial (alta o baja), frecuencia cardiaca elevada, frecuencia respiratoria elevada, hipersensibilidad abdominal, y los ruidos intestinales pueden estar reducidos.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es asma.

35 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es una enfermedad inflamatoria localizada. Los estudios han referido que los valores circulantes de IL-6 y TNF- α desempeñan un papel importante en la inducción de una respuesta inflamatoria local (Xing, Z. J. Clin. Invest. 101 (2):311-320, 1998).

40 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es una enfermedad cardiovascular ateroesclerótica (ateroesclerosis, EVAE). La EVAE es una afección en la que una pared arterial se engrosa como resultado de la acumulación de materiales grasos, como el colesterol. Es un síndrome que afecta a los vasos sanguíneos arteriales (una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias) debido parcialmente a la acumulación de glóbulos blancos macrófagos y promovido por lipoproteínas de baja densidad sin la eliminación adecuada de grasas y colesterol de los macrófagos por lipoproteínas de alta densidad funcionales. Los estudios han implicado IL-1 β como una proteína reguladora en el desarrollo y las secuelas clínicas de ateroesclerosis (Moyer, C.F., y col. Am. J. Pathol. 138(4):951-960, 1991). Los estudios adicionales han descrito que IL-6 y TNF- α están asociados también con factores de riesgo de ateroesclerosis (Haddy, N., y col. Atherosclerosis. 70(2):277-283. 2003). Los síntomas de la enfermedad cardiovascular ateroesclerótica incluyen, pero no se limitan a, ataque al corazón, muerte súbita cardiaca (muerte en el plazo de una hora desde el inicio del síntoma), enfermedad oclusiva arterial periférica, aterogenia (proceso de desarrollo de placas ateromatosas) y estenosis.

50 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (EA) es una forma de demencia. La EA se caracteriza por pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales. Esta pérdida produce una atrofia importante de las regiones afectadas, que incluye degeneración en el lóbulo temporal y el lóbulo parietal, y partes de la corteza frontal y la circunvolución cingulada. La causa y la progresión de la EA no se conocen bien aunque generalmente se cree que afectan a los ovillos neurofibrilares y amiloide β . Algunos estudios han sugerido que la amiloidogénesis en la EA procede de una reacción en fase aguda mediada por IL-1 β /IL-6 en el encéfalo (Vandenabeele, P. y Fiers, W. Immunol. Today. 12(7):217-9. 1991). Estudios adicionales han sugerido una correlación entre el nivel de expresión de TNF- α e IL-1 β y el deterioro cognitivo (Alvarez, X., y col. Mol. Chem. Neuropathol. 29(2-3):237-252. 1996). Los síntomas de EA incluyen, pero no se limitan a, pérdida de memoria, confusión, irritabilidad, agresividad, cambios de estado de ánimo

y muerte.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es una enfermedad oncológica. Las enfermedades oncológicas incluyen, pero no se limitan a, cánceres de origen epitelial que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama y cáncer de próstata. Según algunas realizaciones, el trastorno es cáncer de mama. Según algunas realizaciones, el trastorno es cáncer de próstata.

El cáncer de mama es un cáncer que se forma en tejidos de la mama, normalmente los conductos (tubos que transportan leche al pezón) y los lóbulos (glándulas que fabrican la leche). Existen cuatro estadios del cáncer de mama, El Estadio 0 (carcinoma *in situ*) incluye carcinoma lobulillar *in situ* ("CLIS") y carcinoma ductal *in situ* ("CDIS"), en el que las células cancerosas están presentes en el revestimiento de un lobulillo o un conducto, respectivamente. El Estadio 1 es un estadio temprano de cáncer de mama invasivo en el que el tumor no tiene más de 2 cm de diámetro y las células cancerosas no se han extendido más allá de la mama. En el Estadio II, el tumor es (i) de no más de 2 cm de diámetro y el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos debajo del brazo; (ii) entre 2-4 cm de diámetro y el cáncer puede haberse extendido a los ganglios linfáticos debajo del brazo; o (iii) el cáncer es de más de 5 cm de diámetro y el cáncer no se ha extendido a los ganglios linfáticos debajo del brazo. El Estadio III puede ser un tumor grande, pero el cáncer no se ha extendido más allá de la mama y los ganglios linfáticos cercanos. Es un cáncer avanzado localmente. En el Estadio IIIA, el tumor puede ser no menor de 5 cm de diámetro y se ha extendido a los ganglios linfáticos debajo del brazo. En el Estadio IIIB, el tumor ha crecido en la pared torácica o la piel de la mama y el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos por detrás del esternón. En el Estadio IIIC, el tumor es de cualquier tamaño y se ha extendido a los ganglios linfáticos debajo del brazo, detrás del esternón, y por debajo o por encima de la clavícula. El Estadio IV es un cáncer metastásico distante en el que el cáncer se ha extendido a otras partes del cuerpo. Los estudios han referido que los niveles de IL-6 son elevados en pacientes con cáncer de mama metastásico (Zhang, GJ., y Adachi, I. *Anticancer Res.* 19(2B):1427-1432, 1999) y que TNF- α puede potenciar la capacidad de IL-6 de estimular la síntesis de estrógenos en los tumores de mama (Reed, MJ., y Purohit, A. *Endocrine Rev.* 18(5):701-715, 1997). Los estudios adicionales han descrito que la IL-1 β asociada a tumores está presente en el microentorno del tumor y puede desempeñar un papel fundamental en la regulación del crecimiento del tumor de mama y la metástasis (Kurtzman, S. H., y col. *Oncology Reports.* 6(1):65-70, 1998).

El cáncer de próstata es un cáncer que se forma en los tejidos de la próstata (una glándula del sistema reproductor masculino situada debajo de la vejiga y delante del recto). Existen cuatro estadios del cáncer de próstata. En el Estadio 1, el cáncer no puede palparse durante una exploración rectal digital, y no puede apreciarse en una ecografía. Se encuentra por casualidad cuando se lleva a cabo una intervención quirúrgica por otra razón. El cáncer en estadio 1 está sólo en la próstata y el grado es G1 (o la puntuación de Gleason es no superior a 4). En el Estadio II, el tumor está más avanzado o en un grado superior que el Estadio 1, pero el tumor no se extiende más allá de la próstata. Puede palparse durante una exploración rectal digital, o puede observarse en una ecografía. En el Estadio III, el tumor se extiende más allá de la próstata y puede haber invadido las vesículas seminales, pero todavía no se ha extendido a los ganglios linfáticos. En el Estadio IV, el tumor puede haber invadido la vejiga, el recto o las estructuras próximas (más allá de las vesículas seminales). Puede haberse extendido a los ganglios linfáticos, los huesos u otras partes del cuerpo. Los estudios han referido que los niveles séricos de IL-6 y TNF- α eran significativamente más altos en pacientes con enfermedad metastásica que en los pacientes con enfermedad localizada, y que los niveles de las dos citocinas estaban correlacionados directamente con la extensión de la enfermedad (Michalaki, V., y col. *Br. J. Cancer.* 90(12):2312-6, 2004). Los estudios adicionales han descrito que IL-1 β se requiere para la angiogenia *in vivo* y la invasividad de diferentes células tumorales (Voronov, E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(5):2645-2650, 2003). Un hombre con cáncer de próstata puede no tener síntomas. Para hombres que tienen síntomas, los síntomas comunes incluyen, pero no se limitan a, problemas urinarios, impotencia, sangre en la orina o el semen y dolor frecuente en la espalda lumbar, las caderas o la parte superior de los muslos.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es isquemia. La isquemia es una restricción en el riego sanguíneo, generalmente debido a factores en los vasos sanguíneos, con disfunción tisular resultante. Los estudios han referido que los niveles de IL-6, IL-1 β y TNF- α están aumentados durante el periodo de recirculación temprana después de una isquemia (Saito, K., y col. *Neurosci. Lett.* 206(2-3): 149-152, 1996). Los síntomas de isquemia incluyen, pero no se limitan a, a falta de oxígeno y glucosa en el flujo sanguíneo. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno es isquemia neural.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es artritis reumatoide (AR). Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es enfermedad de Crohn. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es enfermedad inflamatoria intestinal.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es hiperplasia íntima. La hiperplasia íntima es un engrosamiento de la túnica íntima (la capa más interna de una arteria o una vena) de un vaso sanguíneo como una complicación de un procedimiento de reconstrucción o endoarterectomía (la limpieza quirúrgica de un revestimiento arterial engrosado con acumulación de grasa de manera que se abra y ensanche la arteria para mejorar la circulación sanguínea). Implica la estimulación coordinada de células de músculo liso por factores mecánicos, celulares y humorales para inducir un programa de activación celular que conduce a proliferación, migración y depósito de matriz extracelular. La hiperplasia íntima es la respuesta universal de un vaso a la lesión. Los estudios han referido que la sobreexpresión de IL-6, regulada por IL-1 β y TNF- α , desempeña un papel importante en las

células asociadas a ateroma (Kornman, K. y col. *J. Perio. Res.* 34(7):353-357. 2006; Libby, P., y col. *Circulation.* 86(6 Suppl):III47-52. 1992)).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es estenosis. La estenosis es el estrechamiento anómalo en un vaso sanguíneo u otro órgano o estructura tubular. El síndrome resultante depende de la estructura afectada. Los estudios han referido que la sobreexpresión de IL-6, regulada por IL-1 β y TNF- α , desempeña un papel importante en las células asociadas a ateroma (Id). Los síntomas de estenosis pueden incluir, pero no se limitan a, cianosis (coloración azul de la piel y las membranas mucosas, cambios atróficos como pérdida de cabello y piel lustrosa, reducción de la temperatura corporal, disminución del pulso, parestesia, y parálisis. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno es reestenosis (reaparición de estenosis).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es tumores de las células de músculo liso y metástasis. Se han estudiado varios tumores de las células de músculo liso, y la metástasis de los mismos. Incluyen el leiomioma. Estas neoplasias son generalmente neoplasias benignas del músculo liso que no son premalignas y que pueden aparecer en cualquier órgano, como el útero, el intestino delgado y el esófago. Los miomas uterinos son leiomiomas del músculo liso uterino. Aunque benignos, los miomas uterinos pueden provocar un sangrado menstrual excesivo, anemia e infertilidad. Los leiomiomas de la piel incluyen leiomioma cutáneo solitario, leiomiomas cutáneos (o pilares) múltiples que proceden de los músculos erectores del pelo, angioleiomiomas (leiomiomas vasculares), leiomiomas dartoicos (o genitales) que se originan en el músculo darto de los genitales, la areola y el pezón, y angiolipoleiomioma. Los estudios han referido que la cavidad uterina en el leiomioma, la adenomiosis y el grupo de pólipos endometriales contienen niveles elevados de citocinas, como IL-1 β y TNF- α (Inagaki, N., y col. *Eur. J. Obst. Gyn.* 111(2): 197-203, 2003). Estudios adicionales han descrito que IL-6 se expresa también en el leiomioma (Luo, X y col., *Endocrinology.* 146(3): 1097-1118, 2005).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un espasmo del músculo liso. Un espasmo del músculo liso es la contracción súbita e involuntaria de un músculo liso (o grupo de músculos). Los estudios han referido que la reactividad vascular en las arterias de resistencia está relacionada con el equilibrio entre IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Vila, E. y Salices, M. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H1016-H1021, 2005).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es angina (angina de pecho). La angina es un dolor torácico intenso debido a isquemia miocárdica. Los estudios han referido que los niveles elevados de IL-6 son comunes en la angina inestable y están asociados con un mal pronóstico (Biasucci, L., y col. *Circulation.* 94: 874-877. 1996). Además, los estudios han referido una asociación entre el nivel de expresión de IL-6 y TNF- α con mortalidad coronaria (Koukkunen, H., y col. *Annals Med.* 33(1):37-47. 2001). Los síntomas de angina incluyen, pero no se limitan a, molestias torácicas, dolor torácico, presión, pesadez, tensión, compresión, quemazón o sensación de asfixia en el pecho, el epigastrio, dolor en la espalda, dolor en la zona de cuello, dolor en la mandíbula, dolor en los hombros, náuseas, vómitos y palidez.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es angina de Prinzmetal (angina variante). La angina de Prinzmetal se produce en pacientes con arterias coronarias normales o ateroesclerosis insignificante. Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, los de angina, y normalmente aparecen en reposo (no durante el ejercicio) en ciclos,

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es bradicardia (bradiarritmia). La bradicardia se refiere a una frecuencia cardíaca en reposo de menos de 60 latidos por minuto. Los estudios han referido que los niveles incrementados de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se asocian con bradicardia (Fukuhara, Y., y col. *Toxicol.* 41(1):49-55. 2003). Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es bradiarritmia,

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es hipertensión. La hipertensión se refiere a una presión arterial elevada (alta presión arterial). Los estudios han referido que los niveles incrementados de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se asocian con bradicardia (Fukuhara, Y., y col. *Toxicol.* 41(1):49-55. 2003). Los síntomas de hipertensión incluyen, pero no se limitan a, cefalea, somnolencia, confusión, trastornos visuales, náuseas, vómitos, convulsiones, irritabilidad y dificultad respiratoria,

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es hipertrofia cardiaca (aumento de tamaño del corazón). La hipertrofia ventricular es el aumento de tamaño de los ventrículos en el corazón. La hipertrofia ventricular se asocia generalmente con cambios patológicos debidos a hipertensión (u otros estados patológicos). Los estudios han referido que IL-1 β y TNF- α son suficientes para estimular respuestas de crecimiento hipertrófico y han sugerido que la sobreexpresión de IL-6 puede conducir a hipertrofia cardiaca (Yokoyama, T., y col. *Circulation.* 95:1247-1252. 1997). Los síntomas de hipertrofia cardiaca pueden incluir, pero no se limitan a, cefalea, somnolencia, confusión, trastornos visuales, náuseas, vómitos, convulsiones, irritabilidad y dificultad respiratoria.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es insuficiencia renal. La insuficiencia renal (fallo renal) se produce cuando los riñones dejan de funcionar adecuadamente. Los estudios han referido la asociación de IL-1 β y TNF- α (Descamps-Latscha, B., y col. *J. Immunol.* 154(2):882-892. 1995) y de aumento de IL-6 (Herbelin, A., y col. *Kidney Internat'l.* 39:954-960, 1991) con la insuficiencia renal. Los síntomas de insuficiencia renal incluyen, pero no se limitan a, altos niveles de urea en la sangre, acumulación de fosfatos en la sangre, náuseas, vómitos,

pérdida de peso, micción nocturna, prurito, ritmos cardiacos anómalos, hinchazón en las piernas, los tobillos o los pies y dolor de espalda o en el costado.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un accidente cerebrovascular. Un accidente cerebrovascular es la pérdida de función cerebral debido a una perturbación en el riego sanguíneo en el encéfalo.

5 Los estudios han referido que los niveles séricos de IL-6 y TNF- α aumentan después de un accidente cerebrovascular (Ferrarese, C., y col. *J. Cerebral Blood Flow Metabol.* 19: 1004-1009, 1999) y que el nivel de expresión de IL-1 β está regulado por aumento después de una isquemia cerebral focal (Wang, X., y col. *Stroke.* 28:155-162, 1997). Los síntomas de accidente cerebrovascular incluyen, pero no se limitan a, hemiplejia, entumecimiento, reducción en la sensación sensitiva o vibratoria, alteración del olfato, caída de los párpados, 10 problemas de equilibrio, afasia, apraxia, déficits de memoria y vértigo.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es hipertensión pulmonar. La hipertensión pulmonar se refiere a un aumento de la presión arterial en la arteria pulmonar, la vena pulmonar o los capilares pulmonares. Los estudios han referido que los niveles de TNF- α están elevados, sin diferencias en los niveles séricos de IL-6, en 15 pacientes con hipertensión pulmonar (Joppa, P., y col. *Chest.* 130(2):326-333. 2006). Los síntomas de hipertensión pulmonar incluyen, pero no se limitan a, disnea, mareo, desvanecimiento, edema periférico e insuficiencia cardiaca.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es toxemia del embarazo. La toxemia del embarazo (trastorno hipertensivo del embarazo) se refiere colectivamente a preeclampsia y eclampsia. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es preeclampsia. La preeclampsia es una afección en la que se produce hipertensión en el embarazo en asociación con cantidades importantes de proteínas en la orina. Los estudios han referido que los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF- α estaban aumentados en mujeres con 20 preeclampsia en comparación con las que seguían embarazos normales en el tercer trimestre (Conrad, K. y col. *Am. J. Repro. Immunol.* 40(2): 102-111, 1998). Además, los niveles de IL-1 β aparecieron sin cambios entre los grupos de sujetos (Id.). Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, presión arterial elevada, daño generalizado en el endotelio, 25 los riñones y el hígado maternos. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es eclampsia. La eclampsia se caracteriza por la aparición de convulsiones tónico-clónicas (gran mal). Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un parto prematuro.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es la enfermedad/fenómeno de Raynaud. La enfermedad de Raynaud es un trastorno vascular que afecta al flujo sanguíneo de las extremidades (los dedos de las manos y los pies, la nariz y las orejas) cuando se exponen a temperaturas frías o en respuesta a estrés psicológico. Los estudios han referido que IL-6 y TNF- α (Rychlik, W., y col., *Int. Angiol.* 25(4):436. 2006) desempeñan un papel en la patogenia del fenómeno de Raynaud. Los síntomas de la enfermedad de Raynaud incluyen, pero no se limitan a, cianosis, y palidez. La enfermedad de Raynaud se diagnostica si los síntomas son idiopáticos, mientras que el fenómeno de Raynaud ocurre de forma secundaria a una amplia variedad de otras afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, trastornos del tejido conjuntivo, lupus eritematoso sistémico, artritis y 35 otras enfermedades reumáticas.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es uremia hemolítica. Los estudios han referido que TNF- α e IL-1 desempeñan papeles importantes en la inducción del mediador inflamatorio verocitoxina-1 durante el 40 síndrome de uremia hemolítica (van de Kar, N.C., y col. *Blood.* 80(11):2755-2764, 1992). Estudios adicionales han referido que los niveles de IL-6 también se vuelven elevados (Karpman, D., y col. *Ped. Nephrol.* 9(6):694-699, 1995). La uremia hemolítica es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica (descomposición anómala de glóbulos rojos), insuficiencia renal aguda (uremia) y bajo recuento de plaquetas (trombocitopenia).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es una fisura anal. Una fisura anal es una grieta o desgarro natural en la piel del conducto anal. La mayoría de las fisuras anales están causadas por estiramiento de la mucosa anal más allá de su capacidad. Las fisuras anales superficiales o someras generalmente se curan 45 espontáneamente. Algunas fisuras anales se cronifican y se vuelven profundas y no cicatrizan. La causa más común de la no cicatrización es el espasmo del músculo esfínter anal interno que provoca un deterioro del riego sanguíneo en la mucosa anal. Los estudios han referido que los valores de IL-1 β , IL-6 en la mucosa rectal y séricos de IL-6 y TNF- α eran más elevados en los en pacientes con enfermedad de Crohn perianal que en los pacientes con enfermedad de Crohn del intestino delgado y los controles sanos (Ruffolo, C., y col. *Infl. Bowel Dis.* 14(10):1406-50 1412, 2008).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es acalasia. La acalasia (acalasia esofágica, acalasia del cardias, cardioespasmo, aperistaltismo esofágico) es un trastorno de la motilidad esofágica. La capa de músculo liso del esófago pierde su peristaltismo normal y el esfínter esofágico inferior no consigue relajarse adecuadamente en respuesta a la deglución. Los estudios han referido que IL-6 e IL-1 β se producen en cantidades 55 significativamente mayores en la mucosa de pacientes con esofagitis que en los pacientes de control (Rieder, F., y col. *Gastroenterol.* 132(1):154-165, 2007). Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, disfagia, regurgitación, pérdida de peso, tos y dolor torácico.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es impotencia. La disfunción eréctil (DE) es una disfunción sexual caracterizada por la incapacidad de desarrollar o mantener una erección del pene. La erección se

produce como un efecto hidráulico debido a la entrada de sangre que es retenida en cuerpos de tipo esponja dentro del pene. Los estudios han referido que el aumento en los niveles sanguíneos de IL-6, IL-1 β y TNF- α en pacientes con DE está correlacionado negativamente con el desempeño sexual (Vlachopoulos, C, y col. Eur. Heart. J. 27(22):2640-2648. 2006). La DE puede ser un síntoma de una enfermedad cardiovascular.

5 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es migraña. Una migraña es un síndrome neurológico caracterizado por cefaleas intensas, náuseas y alteración de las percepciones corporales. Los estudios han referido un aumento de los niveles séricos de IL-6 y TNF- α durante los ataques de migraña (Peterlin, B., y col., Cephalgia. 27(5):435-446. 2007). Una cefalea con migraña es unilateral y pulsátil, y dura de 4 horas a 72 horas; los síntomas incluyen, pero no se limitan a, náuseas, vómitos, fotofobia y fonofobia.

10 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es lesión muscular isquémica asociada con espasmo del músculo liso. Los estudios han referido que IL-1, IL-6 y TNF- α provocan un efecto inotrópico negativo e inducen induce apoptosis en el miocardio sujeto a isquemia-reperfusión (Saini, H.K., y col. Exp. Clin. Cardiol. 10(4):213-222, 2005).

15 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es vasculopatía. La vasculopatía se refiere a un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la destrucción inflamatoria de los vasos sanguíneos. Pueden verse afectadas tanto las arterias como las venas. Los estudios han referido que IL-6 es un factor de riesgo importante para el trasplante cardiaco relacionado con la vasculopatía coronaria (Densem, C., y col. J. Heart Lung Transpl. 24(5):559-565, 2005). Los síntomas de vasculopatía incluyen, pero no se limitan a, fiebre, pérdida de peso, púrpura, livedo reticular, mialgia o miositis, artralgia o artritis, mononeuritis múltiple, cefalea, accidente cerebrovascular, acúfeno, reducción de la agudeza visual, pérdida visual aguda, infarto de miocardio, hipertensión, gangrena, sangrado nasal, tos con sangre, infiltrados pulmonares, dolor abdominal, heces sanguinolentas y glomerulonefritis.

20 25 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es insuficiencia cardiaca congestiva (ICC). La insuficiencia cardiaca congestiva es una afección en la que el corazón es incapaz de mantener una circulación adecuada de la sangre en el organismo. Los estudios han referido que los pacientes con ICC presentan niveles aumentados de IL-6 y TNF- α en comparación con los sujetos sanos normales (Aukrust, P. y col. Am. J. Cardiol. 83(3):376-382. 1999). Los síntomas típicos de ICC incluyen, pero no se limitan a, disnea, tos, hinchazón de los pies y los tobillos, tumefacción del abdomen, aumento de peso, pulso rápido o irregular, fatiga, debilidad, arritmias, anemia e hipertiroidismo.

30 35 40 45 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es miocardio aturdido o en hibernación. La expresión "isquemia miocárdica crónica (IMC)" como se usa en la presente memoria se refiere a un estado subagudo o crónico prolongado de isquemia miocárdica debido a estrechamiento de un vaso sanguíneo coronario en el que el miocardio "hiberna", lo que significa que el miocardio regula por disminución o reduce su contractilidad, y con ello su demanda de oxígeno miocárdico, para igualar la perfusión reducida, con lo que conserva la viabilidad celular y previene la necrosis miocárdica. Este miocardio en hibernación es capaz de recuperar la función normal o casi normal con la restauración de un riego sanguíneo adecuado. Sin embargo, una vez restaurado el flujo sanguíneo coronario a lo normal o casi normal y resuelta la isquemia, el miocardio en hibernación sigue sin contraerse. Esta falta de correspondencia entre flujo y función que produce un retorno lento de la función cardiaca después de la resolución de la isquemia se ha denominado aturdimiento. La duración de tiempo para que se recupere la función es bastante variable, comprendida entre unos días y unos meses, y depende de una serie de parámetros, que incluyen la duración del accidente isquémico original, la gravedad de isquemia durante el accidente original y la adecuación del retorno del flujo arterial. Diversos estudios han aportado evidencias de inflamación en el miocardio en hibernación. Heusch, G. y col., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288: 984-99 (2005). Los estudios han referido también que citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α están elevadas después de una revascularización coronaria sin complicaciones y pueden contribuir a isquemia miocárdica postoperatoria y anomalías en las paredes segmentarias (Rankin, J. J. Thorac. Cardiovas. Surg. 108:626-35. 1994).

50 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es disfunción diastólica. La disfunción diastólica se refiere a una anomalía en el llenado del corazón (es decir, el ventrículo izquierdo) durante la diástole. La diástole es la fase del ciclo cardíaco en la que el corazón (es decir, el ventrículo) no se contrae sino que en realidad está relajado y se llena de sangre que regresa a él, ya sea desde el cuerpo (en el ventrículo derecho) o desde los pulmones (en el ventrículo izquierdo). Los estudios han relacionado a IL-6, IL-1 β y TNF- α en la mediación de la depresión miocárdica en una septicemia sistémica y otra forma de disfunción cardíaca (Kelly, R., y Smith, T. W. Circulation, 95:778-781, 1997). Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, edema pulmonar, hipertensión, estenosis aórtica, tejido cardíaco cicatrizado y diabetes.

55 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es gliosis (lo que significa una proliferación de astrocitos, que puede incluir depósito de matriz extracelular (MEC) en áreas dañadas del sistema nervioso central). Los estudios han referido que IL-1 e IL-6 impulsan la formación de cicatrices gliales, mientras que TNF- α , que no induce liberación de IL-6, no induce gliosis (Woiciechowsky, C, y col. Med. Sci. Monit. 10(9):BR325-330. 2004).

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es enfermedad pulmonar obstructiva crónica

(EPOC) (que significa enfermedades del aparato respiratorio caracterizadas por obstrucción o limitación del flujo aéreo; lo que incluye, pero no se limita a, bronquitis crónica y enfisema). Se han medido niveles aumentados de IL-6, IL-1 β y TNF- α en el esputo de pacientes con EPOC (Chung, K. Eur. Respir. J. 18:50s-59S, 2001).

5 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es osteopenia. La osteopenia es una afección en la que la densidad mineral ósea (que indica lo denso y fuerte que es el hueso) es menor que la de un sujeto sano normal pero no suficientemente baja para ser clasificada como osteoporosis. La osteopenia puede definirse como una puntuación T de densidad mineral ósea comprendida entre -1,0 y -2,5 medida por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Los estudios han referido que IL-1 β , IL-6 y TNF- α desempeñan un papel en la inducción de resorción ósea (Rifas, L. Calcif. Tissue Int. 64:1-7. 1999).

10 10 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es artritis degenerativa (artrosis, OA). La artrosis es un tipo de artritis que está causada por la descomposición y posible pérdida de cartílago de una o más articulaciones. La artrosis afecta comúnmente a las manos, los pies, la columna y las grandes articulaciones que soportan peso como las caderas y las rodillas. Los estudios han referido que los cambios inflamatorios crónicos con producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) son una característica de las membranas sinoviales de pacientes con artrosis precoz (Smith, M.D., y col., J. Rheumatol. 24(2):365-371, 1997). Los síntomas de artrosis incluyen, pero no se limitan a, dolor en la o las articulaciones afectadas después del uso repetitivo, tumefacción, calidez y crujido de la o las articulaciones afectadas.

15 20 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es espondilitis anquilosante. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es enfermedad de Sjögren. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es síndrome de Guillain-Barré. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es esclerodermia.

25 30 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es septicemia. La septicemia es una afección caracterizada por un estado inflamatorio de todo el organismo (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)), y la presencia de una infección conocida o sospechada. El organismo puede desarrollar esta respuesta inflamatoria a los microbios en la sangre, la orina, los pulmones, la piel u otros tejidos. Los estudios han relacionado a IL-6 y TNF- α como mediadores clave en la inflamación, morbilidad y mortalidad asociadas con septicemia (Leon, L, y col. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 275:R269-R277, 1998). Los síntomas de septicemia incluyen, pero no se limitan a, inflamación aguda presente en todo el organismo, fiebre, recuento leucocitario elevado, náuseas y vómitos, frecuencia cardiaca elevada y aumento de la frecuencia respiratoria. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno es shock endotoxémico. La septicemia es una dolencia sistémica con toxicidad debida a la invasión del torrente sanguíneo por bacterias virulentas que proceden de un asiento de infección local. Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, escalofríos, fiebre y fatiga.

35 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es psoriasis.

40 45 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es enteritis por radiación. La enteropatía por radiación (enteritis por radiación) es una inflamación (tumefacción) del revestimiento del intestino delgado debido a radioterapia. Los estudios han referido que los niveles de ARNm de IL-1 β y TNF- α aumentan después de la irradiación, y que la expresión de IL-6 se vuelve elevada (Linard, C, y col. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phy. 58(2):427-434. 2004). Los síntomas de enteritis por radiación incluyen, pero no se limitan a, anorexia, diarrea, náuseas, vómitos y pérdida de peso.

50 55 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es cirrosis. La cirrosis es la cicatrización del hígado y una función hepática deficiente como consecuencia de una enfermedad hepática crónica (EHC). Los estudios han referido que los niveles séricos de IL-1 β , TNF- α e IL-6 eran elevados en pacientes con enfermedad hepática crónica, y que un grupo cirrótico de pacientes con EHC mostró niveles séricos más elevados de IL-1 β , IL-6 y TNF- α que los casos no cirróticos (Tilg, H., y col. Gastroenterology. 103(1):264-74. 1992). Los síntomas de cirrosis incluyen, pero no se limitan a, hemorroides sanguínes, confusión, impotencia, ictericia, náuseas y vómitos, pérdida de peso, meteorismo, indigestión abdominal, fiebres, dolor abdominal y disminución de la producción de orina.

55 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es fibrosis intersticial. La enfermedad pulmonar intersticial, o EPI, incluye más de 180 trastornos pulmonares crónicos, que pueden ser crónicos, no malignos (no cancerosos) y no infecciosos. Las enfermedades pulmonares intersticiales reciben su nombre del tejido situado entre los sacos aéreos de los pulmones denominados intersticio, que es el tejido afectado por fibrosis (cicatrización). Las enfermedades pulmonares intersticiales pueden llamarse fibrosis pulmonar intersticial o fibrosis pulmonar. Los estudios han referido que los altos niveles de expresión de IL-1 β se acompañan de un aumento local de IL-6 y INF- α y una respuesta tisular inflamatoria aguda vigorosa con evidencia de lesión tisular (Kolb, M., y col. J. Clin. Invest. 107(12):1529-1536, 2001). Los síntomas y el curso de cada una de estas enfermedades puede variar de una persona a otra, pero el enlace común entre las muchas formas de EPI es que todas empiezan con una inflamación, p. ej., bronquiolitis (inflamación que afecta a los bronquiolos (pequeñas vías respiratorias)); alveolitis (inflamación que afecta a los alveolos (sacos aéreos)); o vasculitis (inflamación que afecta a los pequeños vasos sanguíneos (capilares)). Más del 80 % de las enfermedades pulmonares intersticiales se diagnostican como neumoconiosis, una enfermedad inducida por fármacos, o neumonitis con hipersensibilidad. Los otros tipos son sarcoidosis; fibrosis

pulmonar idiopática; bronquiolitis obliterante; histiocitosis X; neumonía eosinófila crónica; enfermedad vascular del colágeno; vasculitis granulomatosa; síndrome de Goodpasture y proteinosis alveolar pulmonar.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es colitis. La colitis es la inflamación (tumefacción) del intestino grueso (colon). La colitis puede tener muchas causas diferentes como, por ejemplo, infecciones agudas y crónicas, trastornos inflamatorios (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis linfocítica y del colágeno), falta de flujo sanguíneo (colitis isquémica) y radiación pasada del intestino grueso. Los estudios han referido que la inhibición de TNF- α en modelos animales de colitis lleva a una reducción de los niveles de IL-1 e IL-6 y a una reducción de la gravedad de la colitis (Neurath, M., y col. Eur. J. Immunol. 27(7): 1743-1750, 2005). Los síntomas de colitis incluyen, pero no se limitan a, hemorragia abdominal, dolor abdominal, heces con sangre, deshidratación, diarrea y aumento de los gases intestinales.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es apendicitis. La apendicitis es la inflamación del apéndice. El apéndice es una pequeña bolsa anexa al intestino grueso. Los estudios han referido que los niveles elevados de IL-6 muestran la mejor tendencia en el diagnóstico de apendicitis aguda (Paajanen, H., y col. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 62(8):579-584, 2002). Estudios adicionales han referido que TNF- α está presente junto con bajos niveles de IL-6 en el líquido peritoneal de pacientes con apendicitis (Fernando, A., y col. Ann. Surg. 237(3):408-416, 2003). Los síntomas de apendicitis incluyen, pero no se limitan a, dolor abdominal, fiebre, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, escalofríos y estreñimiento.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es gastritis. La gastritis es una inflamación del revestimiento del estómago. Las causas comunes de gastritis incluyen, por ejemplo, el alcohol, el tabaco y las infecciones bacterianas. Los estudios han referido que la producción de TNF- α e IL-6 por la mucosa gástrica humana era significativamente mayor en pacientes infectados con *Helicobacter pylori*, todos los cuales tenían gastritis crónica, que en los pacientes negativos para *H. pylori* con la mucosa gástrica histológicamente normal (Crabtree, J., y col. Gut. 32: 1473-1477, 1991). Los síntomas de gastritis incluyen, pero no se limitan a, dolor abdominal, indigestión abdominal, heces oscuras, pérdida de apetito, náuseas, vómitos y vómitos de sangre o un material semejante a granos de café,

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es laringitis. La laringitis es inflamación de la laringe (caja de la voz). La laringitis se asocia normalmente con ronquera de pérdida de la voz. La laringe está situada en la parte superior de la tráquea y contiene las cuerdas vocales. Cuando las cuerdas vocales se inflaman o se infectan, se hinchan. Esto puede causar ronquera, y en ocasiones puede bloquear la vía respiratoria. Los estudios han referido que IL-1 β , IL-6 y TNF- α están aumentados en casos en los que se induce una laringitis por intubación nasogástrica (Lima-Rodrigues, M., y col. Larynscope. 118(1):78-86. 2008). Los síntomas de laringitis incluyen fiebre, ronquera e inflamación de los ganglios linfáticos o glándulas del cuello.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es meningitis. La meningitis es la inflamación de las membranas que cubren el encéfalo y la médula espinal y afecta al líquido cefalorraquídeo. Los estudios han referido que la forma recombinante de IL-6 y TNF- α pueden inducir meningitis o lesión de la barrera hematoencefálica, y sugieren que la generación *in situ* de IL-1 en el líquido cefalorraquídeo (con o sin TNF) es capaz de mediar en la inflamación meníngea y en la lesión de la barrera hematoencefálica observada en diversas infecciones del sistema nervioso central (Quagliarello, V., y col. J. Clin. Invest. 87(4): 1360-1366, 1991). Los síntomas de meningitis incluyen, pero no se limitan a, fiebre y escalofríos, cambios en el estado mental, náuseas y vómitos, fotofobia, cefalea intensa, meningismo, agitación y respiración rápida.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es otitis. La otitis se refiere a la infección o inflamación del oído. La otitis puede afectar a las partes internas o externas del oído. La afección se clasifica según se produzca de forma repentina y durante un tiempo breve (aguda) o de forma repetida durante un periodo de tiempo largo (crónica). Los estudios han referido que los niveles de IL-1 β y TNF- α están elevados en los modelos animales de otitis media (Sato, K., y col. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 108(6):559-63, 1999). Los estudios adicionales han referido niveles elevados de IL-6 en pacientes con otitis media con derrame (Jang, C. y Kim, Y. Int. J. Ped. Otorhinol. 66(1):37, 2002). Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, escalofríos, diarrea, drenaje desde el oído, dolor de oído, ruidos y zumbidos en el oído, fiebre, pérdida de audición, irritabilidad, náuseas y vómitos.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es lesión por reperfusión,

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es lesión cerebral traumática. Una lesión cerebral traumática es causada por un golpe o una sacudida en la cabeza o por una lesión penetrante en la cabeza que trastorna la función normal del encéfalo. No todos los golpes o sacudidas en la cabeza provocan una lesión cerebral traumática. La gravedad de la lesión cerebral traumática puede estar comprendida entre "leve" (un cambio breve en el estado mental o la conciencia) y grave (un periodo extendido de inconsciencia o amnesia después de la lesión). Los estudios han referido que los niveles de IL-6 y TNF- α se vuelven elevados en pacientes con lesión cerebral traumática grave (Csuka, E., y col. J. Neurolimmunol. 101(2):211-21, 1999). Los síntomas de lesión cerebral traumática incluyen, pero no se limitan a, cefaleas o dolor de cuello, dificultad para recordar, concentrarse o tomar decisiones, fatiga, cambios del estado de ánimo, náuseas, fotofobia, visión borrosa, ruidos de timbre en los oídos y pérdida del sentido del gusto o el olfato.

5 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es lesión de la médula espinal. Un traumatismo o lesión de la médula espinal es un daño en la médula espinal que puede proceder de una lesión directa de la médula en sí o de un daño en los huesos, tejidos o vasos sanguíneos circundantes. Los estudios han referido que los niveles de expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β se vuelven elevados en una médula espinal dañada (Hayashi, M., y col. J. Neurotrauma. 17(3):203-18, 2000). Los síntomas de lesión de la médula espinal incluyen, pero no se limitan a, debilidad y pérdida sensitiva en y por debajo del punto de la lesión, dificultades para respirar, pérdida del control normal del intestino y la vejiga, entumecimiento, espasticidad y dolor.

10 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es neuropatía periférica. La expresión "neuropatía periférica" se refiere a un daño en el sistema nervioso periférico. Se ha descrito que IL-6 está sobreexpresada después de una axotomía experimental y que los niveles de IL-1 y TNF- α aumentan progresivamente después de una lesión (aplastamiento de un nervio) (Creange, A., y col. Eur. Cytokine Network. 8(2): 145-51, 1997). Los síntomas están relacionados con el tipo de nervio afectado y pueden verse en un periodo de días, semanas o años. La debilidad muscular es el síntoma más común de daño en los nervios motores. Otros síntomas pueden incluir calambres dolorosos y fasciculaciones (torsiones musculares incontroladas visibles bajo la piel), pérdida muscular, 15 degeneración ósea y cambios en la piel, el pelo y las uñas. El daño en los nervios sensitivos provoca un conjunto de síntomas más complejo dado que los nervios sensitivos tienen un conjunto de funciones más extenso y altamente especializado. Las grandes fibras sensitivas confinadas en la mielina registran la vibración, el tacto ligero y el sentido de la posición. El daño en las grandes fibras sensitivas reduce la capacidad de sentir las vibraciones y el tacto, para producir una sensación general de entumecimiento, especialmente en las manos y los pies. Las pequeñas fibras 20 sensitivas sin vainas de mielina transmiten el dolor y las sensaciones de temperatura. Los síntomas del daño en los nervios autónomos son diversos y dependen de los órganos o glándulas afectados. Los síntomas comunes de daño en los nervios autónomos incluyen incapacidad de sudar normalmente, que puede producir intolerancia al calor; pérdida de control de la vejiga, que puede causar infección o incontinencia; e incapacidad para controlar los 25 músculos que expanden o contraen los vasos sanguíneos para mantener niveles seguros de presión arterial. La pérdida de control sobre la presión arterial puede causar mareo, vahídos o incluso desvanecimiento cuando una persona cambia repentinamente de una posición sentada a bipedestación (una condición conocida como hipotensión ortostática o postural). Los síntomas gastrointestinales acompañan frecuentemente a la neuropatía autónoma. Los nervios que controlan las contracciones de los músculos intestinales a menudo funcionan mal, lo que conduce a diarrea, estreñimiento o incontinencia.

30 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es esclerosis múltiple. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es lupus (lupus eritematoso sistémico).

35 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es síndrome cardiometabólico. El síndrome cardiometabólico (síndrome X, SCM) se define como la presencia de cualquiera de las tres siguientes condiciones: (i) exceso de peso alrededor de la cintura; (ii) altos niveles de triglicéridos; (iii) bajos niveles de HDL (colesterol bueno); (iv) presión arterial elevada; y (v) niveles altos de glucosa en sangre en ayunas. La prevalencia creciente de SCM se ha relacionado con la obesidad, que ha aumentado entre muchos grupos de edad. En la actualidad se acepta que el SCM predice la mortalidad cardiovascular y/o el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. El SCM se complica además con modificaciones en la composición del cuerpo y la redistribución de grasas y a menudo se asocia con alteración de sensibilidad a la insulina. Muchas personas con diabetes presentan varias de estas 40 afecciones al mismo tiempo. Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es la obesidad. La obesidad ha sido definida por los National Institutes of Health (NIH) como un índice de masa corporal (IMC) de 30 y más. El índice de masa corporal es la proporción estandarizada entre el peso y la altura, y a menudo se usa como un indicador general de salud. El IMC puede calcularse dividiendo el peso (en kilogramos) por el cuadrado de la altura (en metros). Un IMC entre 18,5 y 24,9 se considera normal para la mayoría de los adultos. Según algunas de 45 dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es diabetes mellitus tipo II. La diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulinodependiente (DMNID), diabetes de inicio en la edad adulta) es un trastorno metabólico que se caracteriza principalmente por resistencia a la insulina (las células no responden de forma apropiada en presencia de insulina), deficiencia de insulina relativa e hiperglucemia. IL-6 no sólo degrada la sensibilidad a la insulina, sino que también es un determinante mayor de la producción hepática de proteína C reactiva (la fuente más importante de este marcador inflamatorio). Un estudio en los pacientes con diabetes tipo 2 mostró que los niveles circulantes de IL-6 50 están estrechamente correlacionados con el área grasa visceral (AGV), y que la rigidez de la arteria carótida (un índice de ateroesclerosis) estaba correlacionada con la AGV y con los niveles de IL-6 y proteína C reactiva, lo que sugiere que la IL-6 derivada de adipocitos intraabdominal podría intervenir en la ateroesclerosis acelerada de los 55 pacientes con diabetes tipo 2 (Despres, J. Eur. Heart J. Suppl. 8(B):B4-B12, 2006). Los síntomas de la diabetes tipo 2 incluyen, pero no se limitan a, poliuria y polidipsia.

Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es diabetes mellitus tipo I.

60 Según algunas de dichas realizaciones, el trastorno inflamatorio es esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). La EHNA es la inflamación grasa del hígado cuando no se debe a un consumo excesivo de alcohol. En la EHNA, la grasa se acumula en el hígado y termina por formar tejido cicatricial. La EHNA puede derivar en cirrosis. Los estudios refieren que los niveles de TNF- α están aumentados en los pacientes con EHNA (Bahceicoglu, H., y col. Hepatoenterology. 52(65): 1549-53, 2005). Estudios adicionales han referido niveles elevados de IL-6 (Kugelmas, M., y col. Hepatology. 38(2):413-9, 2003) y niveles de IL-1 β (Brun, P., y col. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292:G518-G525,

2007) en los pacientes con EHNA. Los síntomas de EHNA incluyen, pero no se limitan a, fatiga, malestar y molestias sordas abdominales en el cuadrante superior derecho.

En un aspecto de la descripción, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13].

5 Según la presente invención, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KALARQLGVAA [SEQ ID NO: 23].

En otro aspecto de la descripción, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKA [SEQ ID NO: 31].

10 En otro aspecto de la descripción, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRI [SEQ ID NO: 34].

15 Según otro aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencias de aminoácidos con un péptido inhibidor terapéutico, en donde el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], en donde el polipéptido inhibidor terapéutico tiene la actividad de cinasa de una enzima cinasa. En algunos de dichos aspectos, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que tiene al menos el 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos con el péptido inhibidor terapéutico, en donde el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], en donde el polipéptido inhibidor terapéutico tiene la actividad de cinasa de una enzima cinasa. En algunos de dichos aspectos, el péptido inhibidor terapéutico que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14] está ligado operativamente a un elemento regulador controlable. Segundo otro aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14]. Segundo la invención, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. Segundo otra realización, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. Segundo la presente descripción, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]. Segundo otro aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 16]. Segundo otro aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17]. Segundo otro aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18]. Segundo otro aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 20]. Segundo otro aspecto, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

20 Según otra realización, la composición inhibidora de cinasa, en donde es deseable suministrar la composición localmente, puede formularse para administración parenteral por inyección, p. ej., por inyección por bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en envases de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar dichas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosa. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grados como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección oleosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril sin pirógenos, antes de su uso.

25 Las composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones de inhibición de cinasa) también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros como polietilenglicoles,

30 Las formas de preparación farmacéuticas líquidas o sólidas adecuadas están, por ejemplo, microencapsuladas, y si resulta apropiado, con uno o más excipientes, encocleadas, recubiertas en partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, sedimentos para implantación en el tejido, o secadas en un objeto que se frotará en el tejido. Dichas composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de gránulos, perlas, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas,

5 gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación los excipientes y aditivos y/o adyuvantes como desintegrantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchazón, lubricantes o solubilizantes se usan de la forma acostumbrada como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en diversos sistemas de suministro de fármacos. Para una breve revisión de los métodos de suministro de fármacos, véase Langer 1990 Science 249, 1527-1533, que se incluye en la presente memoria como referencia.

10 La composición inhibidora de cinasa, y opcionalmente otros productos terapéuticos, puede administrarse de por sí (limpia) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, aunque pueden prepararse de forma conveniente sales no aceptables farmacéuticamente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Dichas sales incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los ácidos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, dichas sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, como sales de sodio, potasio o calcio del grupo del ácido carboxílico. Por "sal farmacéuticamente aceptable" se entiende aquellas sales que son, dentro del alcance del criterio médico fundado, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y los animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares y sean acordes con una relación beneficio/riesgo aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, P. H. Stahl, y col. describe sales farmacéuticamente aceptables en detalle en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zúrich, Suiza: 2002). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos descritos en la presente invención o por separado mediante la reacción de una función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición ácida representativas incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietansulfonato(isetonato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, pícrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenulfónico y undecanoato. Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con dichos agentes como haluros de alquilos inferiores como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. Se obtienen así productos dispersables o solubles en agua o aceite. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Las sales de adición básica pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos descritos en la invención mediante reacción de una fracción que contiene un ácido carboxílico con una base adecuada como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoniaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares y cationes de amina y amoniaco cuaternario no tóxico que incluyen amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básica incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperacina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos la técnica, por ejemplo mediante la reacción de un compuesto suficientemente básico como una amina con un ácido adecuado que produce un anión fisiológicamente aceptable. Pueden prepararse también sales de ácidos carboxílicos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio o magnesio).

50 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner en asociación un péptido inhibidor de cinasa, o un éster, sal, hidrato, solvato o profármaco del mismo ("compuesto activo") farmacéuticamente aceptable con el vehículo que constituye uno o más agentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y a continuación, si es necesario, modelar el producto en la formulación deseada.

55 El agente farmacéutico o un éster, sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo puede mezclarse con otros materiales activos que no deterioran la acción deseada, o con materiales que suplementan la acción deseada. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea, intratecal o tópica pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, los siguientes componentes; un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes de quelación como ácido etilendiamintetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede confinarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o

plástico. Los vehículos particulares de administración intravenosa son solución salina fisiológica o solución salina con tampón de fosfato (PBS).

Las composiciones farmacéuticas para inyección parenteral comprenden soluciones acuosas o no acuosas, 5 dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles farmacéuticamente aceptables y polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Una "solución" se considera en general una mezcla homogénea de dos o más sustancias. Frecuentemente, aunque no necesariamente, es un líquido. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) están distribuidas uniformemente entre las del disolvente. Como se usa en la presente memoria, "sistema dispersado" o "dispersión" se refiere a un sistema en dos fases en el que una 10 fase se distribuye en forma de partículas o gotículas en la segunda fase, o continua. El término "suspensión" como se usa en la presente memoria se refiere a preparaciones de sustancias no disueltas finamente divididas dispersas en vehículos líquidos. La materia en partículas de una suspensión puede sedimentarse lentamente desde el vehículo líquido en el que está dispersa; por tanto, las suspensiones deben agitarse bien antes de usarlas para asegurar una 15 distribución uniforme del sólido en el vehículo y con ello una dosificación uniforme y apropiada. Como se usa en la presente memoria "emulsión" se refiere a un sistema coloidal en el que tanto la fase dispersada como el medio de dispersión son líquidos inmiscibles en los que el líquido dispersado está distribuido en pequeños glóbulos por todo el cuerpo de líquido del medio de dispersión. Una emulsión básica estable contiene al menos los dos líquidos y un 20 agente emulsionante. Los tipos comunes de emulsiones son aceite en agua, en donde el aceite es el líquido dispersado y una solución acuosa, como agua, es el medio de dispersión, y agua en aceite, en donde, por el contrario, una solución acuosa es la fase dispersada. También es posible preparar emulsiones que son no acuosas.

20 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos, diluyentes, disolvente o soportes adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (como aceite de oliva) y ésteres orgánico inyectables como oleato de etilo. La fluidex adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

25 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes que incluyen agentes conservantes, agentes de humectación, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido súrbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse por el uso de 30 agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto y mezclas de los mismos.

35 Las formas depot inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables como polilactida-poliglucólido. Dependiendo de la proporción entre fármaco y polímero y de la naturaleza del polímero en particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Dichas formulaciones de larga acción pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados moderadamente 40 solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(orthoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones depot inyectables se preparan también atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

45 Las formulaciones inyectables localmente pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención bacteriano o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes del uso. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijados estériles se emplean convencionalmente o como un medio disolvente o de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijado blando que incluya monoglicéridos o diglicéridos 50 sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usan ácidos grasos como el ácido oleico.

55 Las formulaciones para administración parenteral (que incluye pero no se limita a, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intratecal e intraarticular) incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos, que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado de congelación seca (liofilizada) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a 60

partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita anteriormente.

Otro método de formulación de las composiciones descritas en la presente memoria implica la conjugación de los compuestos descritos en la presente memoria con un polímero que potencia la solubilidad acuosa. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen pero no se limitan a polietilenglicol, poli-(d-ácido glutámico), poli-(l-ácido glutámico), poli-(l-ácido glutámico), poli-(d-ácido aspártico), poli-(l-ácido aspártico), poli-(l-ácido aspártico) y copolímeros de los mismos. Pueden usarse ácidos poliglutámicos que tienen pesos moleculares entre aproximadamente 5.000 y 10 100.000, con pesos moleculares entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 80.000 y también pueden usarse con pesos moleculares entre aproximadamente 30.000 y aproximadamente 60.000. El polímero se conjuga por medio de una unión estérica con uno o más hidroxilos de un péptido inhibidor terapéutico de la invención usando un protocolo como se describe esencialmente mediante la patente de EE.UU. nº 5.977.163, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

15 Los agentes de tamponamiento adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

20 En algunas realizaciones, la composición inhibidora de cinasa es una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora de cinasa y opcionalmente otros agentes terapéuticos incluidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El ingrediente activo puede ser una composición inhibidora de cinasa, un péptido inhibidor terapéutico, a PTD, o un dominio terapéutico, o combinaciones de los mismos. Los componentes de las 25 composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse de manera que no exista interacción que degradaría sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada.

30 El o los agentes terapéuticos, que incluyen la composición inhibidora de cinasa, pueden proporcionarse en partículas. Las partículas pueden contener el o los agentes terapéuticos en un núcleo rodeado por un recubrimiento. 35 El o los agentes terapéuticos también pueden dispersarse a través de las partículas. El o los agentes terapéuticos también pueden ser adsorbidos en al menos una superficie de las partículas. Las partículas pueden ser de cualquier orden de liberación de cinética, que incluye liberación de orden cero, liberación de primer orden, liberación de segundo orden, liberación retardada, liberación sostenida, liberación inmediata, etc., y cualquier combinación de los mismos. La partícula puede incluir, además del o de los agentes terapéuticos, cualquiera de aquellos materiales usados rutinariamente en la técnica de farmacia medicina, que incluyen, pero no se limitan a, material erosionable, no erosionable, biodegradable o no biodegradable o combinaciones de los mismos. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la composición inhibidora de cinasa en una solución o en un estado semisólido. Las 40 partículas pueden ser prácticamente de cualquier forma.

45 Los materiales poliméricos no biodegradables y biodegradables pueden usarse en la fabricación de partículas para suministrar el o los agentes terapéuticos. Dichos polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo durante el cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de interés en particular incluyen hidrogeles bioerosionables como se describe en Sawhney y col. en Macromolecules (1993) 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria. Incluyen poliácidos hialurónicos, 50 caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, poliácido acrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

55 El o los agentes terapéuticos pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, a menudo es deseable ralentizar la absorción del fármaco de una inyección subcutánea, intratecal o intramuscular. Esto puede realizarse usando una suspensión líquida de material cristalino o amorfio con baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retrasada de una forma de fármaco administrado parenteralmente se consigue disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

60 El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser adecuado en particular para el tratamiento de afecciones crónicas. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos en la presente memoria.

65 En otra realización, la composición inhibidora de cinasa comprende además un gel, un compuesto sólido o semisólido de liberación lenta, en donde el gel, el compuesto sólido o semisólido de liberación lenta comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor terapéutico y un recubrimiento. El recubrimiento puede ser de cualquier material deseado, preferiblemente un polímero o mezcla de polímeros diferentes. Opcionalmente, el polímero puede ser usado durante la fase de granulación para formar una matriz con el ingrediente activo de manera que se obtenga un patrón de liberación deseado del ingrediente activo. El gel, compuesto sólido o semisólido de liberación lenta es capaz de liberar el agente activo en un periodo de tiempo deseado. El gel, compuesto sólido o

semisólido de liberación lenta puede implantarse en estrecha proximidad en una posición deseada, con lo que la liberación del agente activo produce un efecto farmacológico localizado.

En otra realización, la composición inhibidora de cinasa comprende además un sistema de suministro semisólido que usa un sistema de suministro semisólido, biodegradable y biocompatible o un sistema de múltiples partículas biodegradable biocompatible y suspendido en un sistema de suministro semisólido, biodegradable, biocompatible y biodegradable para inyección, depósito o implantación dentro de o sobre el cuerpo de manera que se faciliten los efectos terapéuticos locales. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es una composición inhibidora de cinasa, un péptido inhibidor terapéutico, un PTD, un dominio terapéutico, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 En otra realización, el sistema de suministro semisólido comprende en parte o en la totalidad un semisólido viscoso biocompatible y biodegradable, en donde el semisólido comprende un hidrogel. En una realización, monooleato de glicerilo, en lo sucesivo referido como GMO, es el sistema de suministro semisólido o hidrogel pretendido. Sin embargo, muchos hidrogeles, polímeros, composiciones de hidrocarburos y derivados de ácidos grasos que tienen propiedades físicas/químicas similares con respecto a la viscosidad/rigidez pueden actuar como un sistema de suministro semisólido. Por ejemplo, pueden usarse polisacáridos sulfatados, que incluyen, pero no se limitan a, heparina.

15 En una realización, el sistema de gel es producido calentando GMO por encima de su punto de fusión (40-50°C) y añadiendo un tampón de base acuosa caliente o una solución de electrolitos, como, por ejemplo, tampón de fosfato o solución salina normal, que así produce una estructura tridimensional. El tampón de base acuosa puede estar compuesto por otras soluciones o combinaciones acuosas que contienen disolventes semipolares.

20 GMO proporciona un hidrogel de base predominantemente lipídica, que tiene la capacidad de incluir materiales lipófilos. GMO proporciona además canales acuosos internos que incluyen y suministran compuestos hidrófilos. Se reconoce que a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), el sistema de gel puede mostrar fases diferentes que comprenden un amplio intervalo de medidas de viscosidad.

25 En una realización, se usan dos fases del sistema de gel debido a sus propiedades a temperatura ambiente y temperatura fisiológica (aproximadamente 37°C) y pH (aproximadamente 7,4). En las dos fases del sistema de gel, la primera fase es una fase laminar de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % de contenido de H₂O y de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 85 % de contenido de GMO. La fase laminar es un líquido moderadamente viscoso, que puede ser fácilmente manipulado, vertido e inyectado. La segunda fase es una fase cúbica que consiste en de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 40 % de contenido de H₂O y de aproximadamente el 85 %-60 % de contenido de GMO. Tiene un contenido de agua en equilibrio desde aproximadamente el 35 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso. La expresión "contenido de agua en equilibrio" como se usa en la presente memoria se refiere a contenido de agua máximo en presencia de exceso de agua. Así la fase cúbica incorpora agua a entre aproximadamente el 35 % en peso y aproximadamente el 40 % en peso. La fase cúbica es altamente viscosa. La viscosidad puede medirse, por ejemplo, mediante un viscosímetro de Brookfield. La viscosidad es superior a 1,2 millones de centipoise (cp); en donde 1,2 millones de cp es la medida máxima de viscosidad que puede obtenerse con la configuración de copa y saliente del viscosímetro de Brookfield. En algunas de dichas realizaciones, puede incorporarse un agente terapéutico en el semisólido de manera que proporcione un sistema para suministro sostenido y continuo del mismo. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un péptido inhibidor terapéutico. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un PTD. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un dominio terapéutico. En algunas de dichas realizaciones, pueden incorporarse otros agentes terapéuticos, agentes biológicamente activos, fármacos, medicamentos e inactivos en el semisólido para proporcionar un efecto biológico, fisiológico o terapéutico local en el organismo a diversas velocidades de liberación.

45 En algunas realizaciones, se usan semisólidos, formulaciones modificadas y métodos de producción alternativos de manera que se altere la naturaleza lipófila del semisólido, o como alternativa, se alteran los canales acuosos contenidos dentro del semisólido. Así, pueden difundirse diversos agentes terapéuticos en diversas concentraciones desde el semisólido a diferentes velocidades, o liberarse de los mismos con el tiempo por medio de los canales acuosos del semisólido. Pueden usarse sustancias hidrófilas para alterar la consistencia del semisólido o la liberación del agente terapéutico por alteración de la viscosidad, la fluidez, la tensión superficial o la polaridad del componente acuoso. Por ejemplo, el monoestearato de glicerilo (GMS), que es estructuralmente idéntico a GMO con la excepción de un doble enlace en el carbono 9 y el carbono 10 de la fracción del ácido graso en lugar de un enlace sencillo, no gelifica al calentarse y la adición de un componente acuoso, como lo hace GMO. Sin embargo, dado que GMS es un tensioactivo, GMS es miscible en H₂O hasta aproximadamente el 20 % peso/peso. El término "tensioactivo" como se usa en la presente memoria se refiere a un agente activo superficial, siendo así miscible en H₂O en concentraciones limitadas así como en sustancias polares. Al calentar y agitar, la combinación del 80 % de H₂O/20 % de GMS produce una pasta extensible que tiene una consistencia semejante a la loción de manos. A continuación se combina la pasta con GMO fundido de manera que forme el gel de la fase cúbica que posee una alta viscosidad como se ha indicado anteriormente. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un péptido inhibidor terapéutico. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un PTD. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un dominio terapéutico.

En otra realización, se usa gelatina hidrolizada, como la disponible comercialmente Gelfoam™, para alterar el componente acuoso. Puede colocarse aproximadamente del 6,25 % al 12,50 % de concentración de Gelfoam™ en peso en una concentración de aproximadamente el 93,75 % al 87,50 % de H₂O respectivamente en peso u otro tampón de base acuosa. Tras calentar y agitar, la combinación de H₂O (u otro tampón acuoso)/Gelfoam™ produce una sustancia gelatinosa espesa. La sustancia resultante se combina con GMO, con lo que el producto así formado se hincha y forma un gel translúcido altamente viscoso que es menos maleable en comparación con el gen GMO limpio en solitario.

En otra realización, pueden usarse polietilenglicoles (PEG) para alterar el componente acuoso y ayudar a la solubilización del fármaco. Aproximadamente del 0,5 % al 40 % de concentración de PEG (dependiendo del peso molecular del PEG) en peso colocados en aproximadamente del 99,5 % al 60 % de concentración de H₂O respectivamente en peso u otro tampón de base acuosa. Tras calentar y agitar, la combinación de H₂O (u otro tampón acuoso)/PEG produce de un líquido viscoso a una sustancia semisólida. La sustancia resultante se combina con GMO, con lo que el producto así formado se hincha y forma un gel altamente viscoso.

Sin estar limitado por ninguna teoría, se postula que el agente terapéutico se libera del semisólido a través de difusión, posiblemente de una forma bifásica. Una primera fase implica, por ejemplo, que un fármaco lipófilo contenido en la membrana lipófila se difunde desde el mismo en el canal acuoso. La segunda fase implica la difusión del fármaco desde el canal acuoso en el entorno externo. Al ser lipófilo, el fármaco puede orientarse dentro del gel de GMO dentro de su estructura propuesta de bicapa lipídica. Así, la incorporación de más de aproximadamente el 7,5 % del fármaco, por ejemplo una composición inhibidora de cinasa, en peso en GMO provoca una pérdida de la integridad de la estructura tridimensional con lo que el sistema de gel deja de mantener la fase cúbica semisólida, y revierte al líquido viscoso en fase laminar. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un péptido inhibidor terapéutico. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un PTD. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un dominio terapéutico. En otra realización, de aproximadamente el 1 a 20 aproximadamente el 45 % de agente terapéutico se incorpora en peso en un gel de GMO a temperatura fisiológica sin desorganización de la estructura tridimensional normal. Como consecuencia, este sistema permite la capacidad de aumentar significativamente la flexibilidad en las dosificaciones del fármaco. Dado que el sistema de suministro es maleable, puede suministrarse y manipularse en un sitio de implante, de manera que se adhiera y se adecúe a los contornos de las paredes, espacios u otros vacíos en el cuerpo y llene completamente todos los vacíos existentes. El sistema de suministro asegura la distribución del fármaco y el suministro uniforme del fármaco en todo el sitio del implante. La facilidad de suministro y manipulación del sistema de suministro dentro de un espacio se facilita por medio de un aparato de suministro de semisólido. Un aparato de suministro de semisólido facilita el suministro dirigido y controlado del sistema de suministro.

En una realización, el componente de multipartículas está formado por sistemas biocompatibles, biodegradables, poliméricos o no poliméricos usados para producir estructuras sólidas que incluye pero no se limita a grageas, 35 sedimentos, cristales, aglomerados, microesferas o nanopartículas.

En otra realización, el componente de multipartículas comprende poli(láctico-co-glicólido) (PLGA). Los PLGA son materiales poliméricos biodegradables usados para el suministro controlado y extendido de agente terapéutico en el organismo. Dichos sistemas de suministro ofrecen una eficacia terapéutica mejorada y una toxicidad global reducida en comparación con la dosificación sistémica y periódica frecuente. Sin estar limitado por ninguna teoría, se postula que los sistemas de PLGA que consisten en diferentes razones molares de las subunidades monoméricas facilitarán una mayor flexibilidad en los perfiles de liberación precisa de ingeniería para dar cabida al suministro del agente terapéutico dirigido a través de alteraciones en la velocidad de degradación de polímero. En una realización, la composición de PLGA es suficientemente pura para ser biocompatible y sigue siendo biocompatible después de la biodegradación. En una realización, el polímero PLGA está diseñado y configurado en microesferas que tienen un agente terapéutico o fármaco atrapado en las mismas, con lo que el agente terapéutico es liberado posteriormente del mismo. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inhibidor de cinasa. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un péptido inhibidor terapéutico. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un PTD. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un dominio terapéutico.

50 En otra realización, el componente de multipartículas está formado por poli d,L(láctico-co-caprolactona). Esta proporciona un material polimérico biodegradable usado para el suministro controlado y extendido de agente terapéutico en el organismo con un mecanismo de liberación del fármaco similar al de los polímeros de PLGA. En una realización, las microesferas de multipartículas se producen también usando materiales no poliméricos biodegradables y/o biocompatibles como GMS.

55 En otra realización, el componente de multipartículas es modificado además por métodos usados para encapsular o recubrir los componentes de multipartículas usando polímeros de la misma composición con las mismas o diferentes sustancias farmacológicas, diferentes polímeros con las mismas o diferentes sustancias farmacológicas, o con procesos de formación de capas múltiples que no contienen fármaco, el mismo fármaco, un fármaco diferente o múltiples sustancias farmacológicas. Esto permite la producción de un sistema de multipartículas en múltiples capas (encapsulado) con un amplio intervalo de perfiles de liberación de fármacos para agentes farmacológicos únicos o múltiples simultáneamente. En otra realización, los materiales de recubrimiento que controlan la velocidad de

difusión física del fármaco de lasmultipartículas pueden usarse en solitario o en concierto con las realizaciones mencionadas anteriormente y las realizaciones contempladas.

En otra realización, la composición inhibidora de cinasa comprende además un sistema de suministro que usa PLGA. El polímero de PLGA contiene enlaces estéricos, que son lábiles para la hidrólisis. Cuando penetra H₂O en el polímero de PLGA, los enlaces estéricos se hidrolizan, y los monómeros, que son solubles en agua, son eliminados del polímero de PLGA, facilitando así la liberación física del fármaco atrapado, por ejemplo, pero sin limitarse a, una composición inhibidora de cinasa, con el tiempo. En algunas de dichas realizaciones, pueden usarse otras clases de polímeros sintéticos biodegradables y biocompatibles para el suministro controlado y extendido de agente terapéutico en el organismo cuerpo, los que incluye polianhídridos, polí(fosfatos), polidioxanona, celulósicos y acrílicos que se extienden como ejemplos no limitativos. En algunas de dichas realizaciones, pueden usarse materiales no poliméricos para el suministro controlado y extendido del agente terapéutico en el organismo, lo que incluye pero no se limita a esteroles, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ácidos grasos y ésteres de colesterol, que se extienden como ejemplos no limitativos.

En otro aspecto, la composición inhibidora de cinasa comprende además un sistema de suministro semisólido, que actúa como un vehículo para el suministro local de agentes terapéuticos, que comprende una sustancia lipófila, hidrófila o anfófila, sólida o semisólida, calentada por encima de su punto de fusión y seguida posteriormente por la inclusión de un componente acuoso caliente de manera que se produzca una composición gelatinosa de viscosidad variable basada en el contenido de agua. El o los agentes terapéuticos se incorporan y se dispersan en el componente lipófilo fundido o el componente tampón acuoso antes de la mezcla y formación del sistema semisólido. La composición gelatinosa se coloca en el aparato de suministro de semisólido para la posterior colocación, o depósito. Al ser maleable, el sistema de gel se suministra y manipula fácilmente por medio del aparato de suministro de semisólido en un sitio de implante, en donde se adhiere y se adecúa a los contornos del sitio de implantación, los espacios u otros vacíos en el organismo así como llenando completamente todos los vacíos existentes. Alternativamente, se usa un componente de multipartículas, formado por un sistema polimérico o no polimérico biocompatible, para producir microesferas que tienen un agente terapéutico atrapado en ellas. Después de los métodos de procesamiento finales, las microesferas se incorporan en el sistema de semisólido y posteriormente se colocan en el aparato de suministro de semisólido de manera que sea suministrado fácilmente desde las mismas en un sitio de implante o un espacio comparable, con lo que el agente terapéutico es liberado posteriormente desde el mismo por un mecanismo o mecanismos de liberación de fármaco.

En otro aspecto, la presente invención proporciona además un dispositivo biomédico que comprende al menos un péptido inhibidor terapéutico aislado, en donde el uno o más péptidos inhibidores terapéuticos aislados están dispuestos sobre el dispositivo o dentro de él. En algunas de dichas realizaciones, el al menos un péptido inhibidor terapéutico es al menos un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12], KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15], YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11], YARAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 16], YARAARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17], YARAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18], YARAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19], YARAARGQRAKALNRQLGVA [SEQ ID NO: 20] y YARAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

Según otro aspecto, la invención descrita proporciona un ácido nucleico aislado que se hibrida específicamente con un ARNm que codifica un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de PTD. La expresión "se hibrida específicamente" como se usa en la presente memoria se refiere al proceso por el cual un ácido nucleico forma de forma distintiva o clara pares de bases con regiones complementarias de al menos una cadena de ADN que no se emparejó originalmente con el ácido nucleico. Por ejemplo, un ácido nucleico que puede unirse o hibridarse con al menos una porción de un ARNm de una célula que codifica un péptido que comprende una secuencia CPP puede considerarse un ácido nucleico que se hibrida específicamente. Un ácido nucleico que se hibrida selectivamente experimenta hibridación, en condiciones de hibridación estrictas, de la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia diana especificada de ácidos nucleicos en un grado detectablemente mayor (p. ej., al menos 2 veces con respecto al sustrato) que su hibridación con secuencias de ácidos nucleicos no diana y con la exclusión sustancial de ácidos nucleicos no diana. Las secuencias que se hibridan selectivamente tienen normalmente aproximadamente al menos el 80 % de identidad de secuencias, al menos el 90 % de identidad de secuencias o al menos el 100 % de identidad de secuencias (es decir, complementarias) entre sí. Según otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que se hibrida específicamente con ARNm que codifica un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de péptidos inhibidores terapéuticos.

Los métodos de extracción de ARN son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en J. Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), vol. 1, ch. 7, "Extraction, Purification, and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells". Otros métodos de aislamiento y extracción son también bien conocidos como, por ejemplo en F. Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, 2007). Normalmente, el aislamiento se realiza en presencia de agentes caotrópicos, como cloruro de guanidinio o tiocianato de guanidinio, aunque pueden usarse alternativamente otros detergentes y agentes de extracción. Normalmente, el ARNm se aísla a partir del ARN extraído total por cromatografía sobre oligo(dT)-celulosa u otros medios cromatográficos que tienen la capacidad de unirse a la

porción 3' poliadenilada de moléculas de ARNm. Alternativamente, pero menos preferiblemente, puede usarse el ARN total. Sin embargo, generalmente se prefiere aislar poli(A)+ARN de fuentes de mamíferos.

Uso en métodos de cinasas inhibidoras que activan citocinas

Según otro aspecto, la presente invención proporciona medios para tratar un trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión inflamatoria de citocinas, comprendiendo el método las etapas de: (a) suministro de una composición inhibidora de cinasa, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico inhibe al menos una enzima cinasa, en donde la composición inhibidora de cinasa comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor terapéutico, en donde el péptido inhibidor terapéutico comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio comprende un dominio de transducción de proteína (PTD) situado proximal al segundo dominio, en donde el segundo dominio comprende un dominio terapéutico situado proximal al primer dominio; (b) administración de la composición inhibidora de cinasa a un sujeto necesitado de la misma, inhibiendo así al menos una enzima cinasa; y (c) reducción de la expresión de al menos una citocina inflamatoria, tratando así el trastorno inflamatorio.

Según una realización, el trastorno inflamatorio cuya fisiopatología comprende la expresión de citocinas inflamatorias es al menos un trastorno seleccionado del grupo que consiste en asma, espondilitis anquilosante, diabetes tipo I, síndrome de Guillain-Barré, lupus, psoriasis, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, vasculitis, vasculitis de hipersensibilidad, shock endotóxico, pancreatitis, enfermedad inflamatoria localizada, ateroesclerosis, enfermedad de Alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenosis, reestenosis, leiomioma, espasmo del músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, bradicardia, hipertensión, hipertrofia cardiaca, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, hipertensión pulmonar, toxemia del embarazo, enfermedad de Raynaud, uremia hemolítica, fisura anal, acalasia, impotencia, migraña, vasculopatía, insuficiencia cardiaca congestiva, miocardio aturrido, disfunción diastólica, glosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteopenia, artritis degenerativa, septicemia, cirrosis, fibrosis intersticial, colitis, apendicitis, gastritis, laringitis, meningitis, otitis, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, síndrome cardiometabólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística del páncreas y los pulmones, fibrosis en el punto de inyección, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis nefrógena sistémica, cáncer de mama, cáncer de próstata y disfunción de las células epiteliales.

Según otra realización, el primer dominio está situado en posición 5' con el segundo dominio. Según otra realización, el segundo dominio está situado en posición 3' con el primer dominio. Según otra realización, el primer dominio está ligado operativamente al segundo dominio. Según otra realización, el segundo dominio está ligado operativamente al primer dominio.

Según otra realización, la enzima cinasa es proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos. Según algunas de dichas realizaciones, la enzima cinasa es MK2. Según algunas de dichas realizaciones, la enzima cinasa es MK3. Según otra realización, la enzima cinasa es CaMK.

Según la presente descripción, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13].

Según la presente invención, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos KALARQLGVAA [SEQ ID NO: 23].

Según otro aspecto, la secuencia de aminoácidos del dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es KAANRQLGVAA [SEQ ID NO: 22]. Según la invención, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos KALARQLGVAA [SEQ ID NO: 23]. Según otro aspecto, el dominio terapéutico del péptido inhibidor terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos KALNAQLGVAA [SEQ ID NO: 24], KALNRALGVAA [SEQ ID NO: 25], KALNRQAGVAA [SEQ ID NO: 26], KALNRQLAVAA [SEQ ID NO: 27], KALNRQLGAAA [SEQ ID NO: 28], KALNRQLGVA [SEQ ID NO: 29] o KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30].

Según la presente descripción, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos WLRRIKAWLRIKA [SEQ ID NO: 31].

Según la presente descripción, el dominio de transducción de proteína del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos WLRIKAWLRI [SEQ ID NO: 34],

Según la presente descripción, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos WLRIKAWLRIKA [SEQ ID NO: 31], WLRIKA [SEQ ID NO: 32], YARAARQARA [SEQ ID NO: 5], YGRKRRQRRR [SEQ ID NO: 33] o WLRIKAWLRI [SEQ ID NO: 34]. Según la invención, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYR [SEQ ID NO: 35]. Según otra realización, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYR [SEQ ID NO: 36]. Según la presente descripción, el PTD del péptido inhibidor de cinasa terapéutico es un dominio que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARQARA [SEQ ID NO:

5], FAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 43] o KAFAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44].

Según la presente descripción, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos WLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14]. Según la invención, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. Según otra realización, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. Según la presente descripción, el péptido inhibidor terapéutico es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11], o YARAAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 16], o YARAAARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17], o YARAAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18], o YARAAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19], o YARAAARGQRAKALNRQLGVA [SEQ ID NO: 20], o YARAAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

Según otra realización, la composición inhibidora de cinasa comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según otra realización, la composición inhibidora de cinasa se administra parenteralmente. Según otra realización, la composición inhibidora de cinasa se administra por medio de un dispositivo biomédico que comprende al menos un péptido inhibidor terapéutico aislado, en donde el uno o más péptidos inhibidores terapéuticos aislados están dispuestos sobre el dispositivo o dentro de él. En algunas de dichas realizaciones, el al menos un péptido inhibidor terapéutico es al menos un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12] y KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15].

Los métodos generales en genética molecular e ingeniería genética útiles en la presente invención se describen en las ediciones actuales de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, y col. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2^a ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), y Gene Transfer and Expression Protocols, pág. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.). Los reactivos, los vectores de clonación y los kits para manipulación genética están disponibles en vendedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, ClonTech y Sigma-Aldrich Co.

Cuando se proporciona un valor de intervalos, debe entenderse que todos los valores intermedios, hasta la decena de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de este intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo establecido están comprendidos dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores que pueden estar incluidos independientemente en los intervalos menores están comprendidos también dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o los dos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de estos límites incluidos están también incluidos en la invención.

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica al que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o las pruebas de la presente invención puede usarse también cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Debe observarse que como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado.

Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan exclusivamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente invención. Nada en la presente memoria debe entenderse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que podría ser necesario confirmar independientemente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa y la descripción de cómo preparar y usar la presente invención, y no pretenden representar que los experimentos mostrados a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Aunque se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a las cifras usadas (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), debe contarse con la existencia de algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o casi la atmosférica.

Métodos

Síntesis y purificación de péptidos

Los péptidos se sintetizaron en resina Rink-amida o Knorr-amida (Synbiosci Corp.) usando química FMOC estándar en un Symphony® Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc.). El reactivo de copulación para los aminoácidos (Synbiosci Corp.) fue hexafluorofosfato de 2-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio/N-metilmaleimida (HBTU/NMM). Después de la síntesis, el péptido se escindió a partir de una resina con un cóctel basado en ácido trifluoroacético, se precipitó en éter y se recuperó por centrifugado. El péptido recuperado se secó al vacío, se resuspendió en agua purificada MilliQ y se purificó usando una cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (ÄKTA Explorer, GE Healthcare) equipada con una columna de escala preparatoria 22/250 C18 (Grace Davidson). Se usó un gradiente de acetonitrilo con una concentración constante ácido trifluoroacético al 0,1 % o ácido acético al 0,1 % para conseguir la purificación. El peso molecular deseado se confirmó por espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) de tiempo de vuelo usando un dispositivo 4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer (Applied Biosystems).

Ejemplo 1. Determinación de aminoácidos esenciales de péptidos inhibidores terapéuticos de MK2

Los aminoácidos esenciales de péptidos inhibidores terapéuticos de MK2 se identificaron usando sustituciones Ala y de D-aminoácidos. 100 µM de KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13] inhibieron el 73 % de la actividad MK2. En primer lugar, cada aminoácido en el dominio terapéutico (KALNRQLGVAA) [SEQ ID NO: 13] se sustituyó independientemente por Ala. A continuación, cada aminoácido en el dominio terapéutico del péptido se sustituyó independientemente por su D-aminoácido.

Ensayo de actividad de cinasa basado en fluorescencia

Se usó el ensayo de cinasa Omnia® para el kit MAPKAP-K2 (Invitrogen, Carlsbad, CA), para determinar la velocidad de reacción para MK2 en presencia y ausencia de cada uno de los péptidos enumerados en la **Tabla 1**. El kit contiene un tampón de reacción de propiedad exclusiva al que se añadió lo siguiente (se proporcionan las concentraciones finales): ATP 1 mM, DTT 0,2 mM, sustrato peptídico modificado con Sox MAPKAP-K2 10 µM, 5 ng de MK2 y el péptido inhibidor de interés (volumen final de 50 µL). Se adquirió MK2 humano de Invitrogen. Las reacciones se realizaron a 30°C en los pocillos de una placa de 96 pocillos de unión a proteínas baja provista del kit, y se tomaron lecturas de fluorescencia (excitación = 360 nm, emisión = 485 nm) cada 30 segundos durante 20 minutos usando el espectrofotómetro SpectraMax M5 (Molecular Devices). Se determinó la velocidad de reacción para cada pocillo de reacción a partir de la pendiente de una representación gráfica de unidades de fluorescencia relativa con respecto al tiempo. Se sometió a ensayo cada péptido inhibidor al menos en cuatro concentraciones, 12,5, 25, 50 y 100 µmol, por triplicado.

En la **Tabla 1**, "a" representa que los resultados mostrados son para 100 µM para todos los péptidos; "b" representa el cambio porcentual en la velocidad de reacción de MK2 con respecto al péptido no sustituido (KALNRQLGVAA) [SEQ ID NO: 13] a una concentración de 100 µM; "c" representa el error comunicado como la desviación típica entre tres muestras.

Tabla 1. Péptidos probados en ensayo de la actividad de cinasa basada en fluorescencia

Péptido inhibidor probado ^a	% de KALNRQLGVAA ^b [SEQ ID NO: 13] Velocidad de reacción (+VoSD) ^c	SEQ ID NO:
Sustituciones con alanina		
KAANRQLGVAA	+52(6)	22
KALARQLGVAA	-61(2)	23
KALNAQLGVAA	+258(14)	24
KALNRQLGVAA	+258(26)	13
KALNRQAGVAA	+18(7)	26
KALNRQLAVAA	-28(5)	27
KALNRQLGAAA	+273(22)	28
Sustituciones con p-aminoácidos		
KAdLNRQLGVAA	46(7)	***

KALdNRQLGVAA	-5(10)	***
KALNdRQLGVAA	+206(7)	***
KALNRdQLGVAA	+176(5)	***
KALNRQdLGVA	+257(17)	***
KALNRQLGdVAA	+160(23)	***
Otras modificaciones		
KALNRQLGVA	0(5)	29
KKKALNRQLGVAA	-9(8)	30
WLRIKAWLRIKALNRQLGV	-132(10)	36
Dominio peptídico de penetración celular		
WLRIKAWLRIKAWLRIKA (no funcional)	4.306(21)	32
WLRIKAWLRIKAWLRIKA	-83(4)	31
YGRKKRRQRRR	+44(17)	33
YARAAARQARA	+149(13)	5

Los estudios de D-aminoácidos y Ala mostraron que la Asn no era esencial para inhibición de MK2 (véase **Tabla 1**, **Figura 3** y **Figura 4**).

5 La **Figura 3** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (unidad de fluorescencia/segundo) (UFR/s) con respecto a la concentración de péptido inhibidor MK2 (μ M) en donde los péptidos inhibidores incluyen las sustituciones de alanina. La sustitución de Asp y Ala potenció la inhibición de MK2. La sustitución de Ala para Gly aumentó ligeramente la inhibición. El estudio de Ala también mostró que Arg, Gln y Val eran esenciales para la inhibición de MK2. Aunque las dos Leu eran aminoácidos menos esenciales, su eliminación disminuyó la eficacia del péptido inhibidor terapéutico.

10 La **Figura 4** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) frente a la concentración péptido inhibidor MK2 (μ M) en donde los péptidos inhibidores incluyen las sustituciones con D-aminoácidos. Ninguna sustitución con D-aminoácidos potenció sustancialmente la inhibición de MK2; la mayor parte de las sustituciones con D-aminoácidos redujeron sustancialmente la eficacia del péptido inhibidor MK2.

15 La **Figura 5** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) frente a la concentración de péptido inhibidor MK2 (μ M) en donde el péptido inhibidor ha sido modificado. La **Tabla 1** y la **Figura 5** muestran que la inhibición de MK2 no fue mejorada por Ala en el extremo C (100 μ M) y la inhibición aumentó ligeramente en dos Lys adicionales en el péptido inhibidor. Sin embargo, la inhibición de MK2 se redujo, a concentraciones menores de péptido inhibidor, tras la eliminación de Ala en el extremo C o la adición de dos Lys en el extremo N.

Ejemplo 2. Inhibición de MK2 por PTD

20 Se demostró que la inhibición de MK2 por los PTD usaba tres PTD: 1) WLRIKAWLRIKA [SEQ ID NO: 31]; 2) YGRKKRRQRRR [SEQ ID NO: 33]; y 3) YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5].

25 La **Figura 6** muestra una representación gráfica de la velocidad de reacción (UFR/s) con respecto a la concentración de inhibidor de MK2 (μ M) en donde el péptido inhibidor es un dominio de transducción de proteína. La **Tabla 1** y la **Figura 4** muestran que la inhibición de MK2 se vio afectada mínimamente por el péptido PTD YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5] con independencia de la concentración del péptido PTD. La actividad de MK2 se inhibió mediante el péptido de PTD YGRKKRRQRRR [SEQ ID NO: 33] en un amplio intervalo de concentración de péptido PTD (del 61 % de inhibición para PTD 100 μ M al 48 % de inhibición para PTD 25 μ M). MK2 fue inhibido de forma potente por el péptido PTD WLRIKAWLRIKA [SEQ ID NO: 31]; este péptido PTD proporcionó una mayor inhibición de MK2 que los péptidos del dominio terapéutico. La **Tabla 1** muestra además la combinación del péptido PTD WLRIKAWLRIKA [SEQ ID NO: 31] y el dominio terapéutico KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13] proporciona un efecto inhibidor sinérgico.

Ejemplo 3. Las modificaciones en el dominio terapéutico afectan a Cl_{50}

El dominio terapéutico de los péptidos inhibidores terapéuticos fue modificado para afectar al valor de Cl_{50} . A continuación se analizaron los péptidos inhibidores terapéuticos modificados con ensayos radiométricos.

Determinación de la Cl_{50} radiométrica y la actividad de cinasa

- 5 Se usó un servicio de ensayo radiométrico comercial (Millipore, Billerica, MA) para probar la especificidad y la potencia de péptidos que contienen un dominio de transducción y un dominio terapéutico acoplados, en lo sucesivo "péptidos completos"). En estos ensayos, si la cinasa no es inhibida por un péptido inhibidor, se fosforila un sustrato de carga positiva con un grupo fosfato radiomarcado de un ATP. El sustrato de carga positiva es atraído a una membrana de filtro de carga negativa, se cuantifica con un contador de centelleo y se compara con un control de la actividad al 100 %. Se escogieron las concentraciones de ATP en 15 μ M de la K_m aparente para ATP dado que una concentración de ATP cercana a K_m puede permitir que las cinasas tengan la misma cantidad relativa de actividad de fosforilación.
- 10

La **Tabla 2** muestra las composiciones de tampón para las cinasas incluidas en el cribado; (h) = humanas, (m) = murinas, (r) = rata, y (y) = levadura.

Composición de tampón	Cinasa(s)
HEPES 180 mM, DTT 3,6 mM, Brij-35 al 0,07 %	AMPK (r)
HEPES 20 mM, Tritón X-100 al 0,03 %	PKC β I (h), PKC δ (h)
MOPS 20 mM, EDTA 1 mM, Brij-35 al 0,01 %, glicerol al 5 %, β -mercaptoetanol al 0,1 %, 1 mg/mL de BSA	Abl (h), Aurora-A (h), BTK (h), CaMKI (h), CDK1/ciclina B (h), CHK1 (h), CHK2 (h), CK1 δ (h), c-Kit (h), DYRK2 (h), EGFR (h), EphA2 (h), FGFR1 (h), GSK3 β (h), IRAK4 (h), JAK3 (h), KDR (h), Lck (h), LIMK1 (h), Met (h), MLCK (h), PDGFR β (h), PhK γ 2 (h), Pim-1 (h), PKA (h), PKB β (h), PKG1 α (h), PKG1 β (h), Ret (h), ROCK-I (h), Rsk2 (h), Src (1-530) (h), Tie2 (h), TrkA (h)
TRIS 25 mM, EGTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol al 0,1 %, 1 mg/mL de BSA	MEK1 (h)
Na- β -glicerofosfato 50 mM, EGTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol al 0,1 %, 1 mg/mL de BSA	PRAK (h)
TRIS 50 mM, 0,1 mM EGTA, Na ₃ VO ₄ 0,1 mM, β -mercaptoetanol al 0,1 %, 1 mg/mL de BSA	IGF-1R (h), MAPK1 (h), SAPK2a (h), Syk (h)

15

Los protocolos para cada ensayo de cinasa son los siguientes:

(1) Abi (h)

- 20 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Abi (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, EAIIYAAPFAKKK 50 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(2) AMPK (r)

- 25 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba AMPK (r) (5-10 mU) con 32 mM HEPES pH 7,4, DTT 0,65 mM, Brij-35 al 0,012 %, AMP 200 μ M, AMARAASAAALAR 200 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.
- 30

(3) Aurora-A (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Aurora-A (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, LRRASLG 200 μ M (Kemptide), acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol,

concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 50 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

5 (4) BTK (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba BTK (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0; EDTA 0,2 mM, KVEKIGEGTYGVVYK 250 μ M (péptido Cdc2), acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

10 (5) CaMKI (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba CaMKI (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, CaCl₂ 0,5 mM, 16 μ g/mL de calmodulina, KKLNRTLSFAEPG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

15 (6) CDK1/ciclina B (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba CDK1/ciclina B (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 0,1 mg/mL de histona H1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

20 (7) CHK1 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba CHK1 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKVKRSRSGLYRSPSMPPENLNRPR 200 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox., 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

25 (8) CK1 δ (h)

30 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba CK1 δ (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KRRRALSPASLPG 200 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

35 (9) CK2 (h)

40 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba CK2 (h) (5-10 mU) con HEPES 20 mM pH 7,6, NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 mM, DTT 5 mM, Tritón X-100 0,1 %, RRRDDDSDDD 165 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

45 (10) c-Kit (h)

50 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba c-Kit (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, MnCl₂ 10 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat A y se lava tres veces

durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(11) DYRK2 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba DYRK2 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 2 mg/mL de caseína, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(12) EGFR (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba EGFR (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, MnCl₂ 10 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat A y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(13) EphA2 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba EphA2 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox., 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat A y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(14) FGFR1 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba FGFR1 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKSPGEGYVNIEFG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(15) Flt3 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Flt3 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, EAIIYAAPFAKKK 50 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(16) GSK3 β (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba GSK3 β (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, YRRAAVPPSPSLRHSSPHQS(p)EDEEE 20 μ M (fosfo GS2 péptido), acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 50 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(17) IGF-1R (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba IGF-I R (h) (5-10 mU) con Tris 50 mM pH 7,5, EGTA 0,1 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, β -mercaptoetanol al 0,1 %, KKSPGEGYVNIEFG 250 μ M, MnCl₂ 10 mM, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(18) IRAK4 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba IRAK4 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de 5 incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo,

(19) JAK3 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba JAK3 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, GGEEBEYFELVKKKK 500 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(20) KDR (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba KDR (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de 20 incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(21) Lck (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Lck (h) (5-10 mU) con Tris 50 mM pH 7,5, EGTA 0,1 mM, Na_3VO_4 0,1 mM, KVEKIGEGTYGVVYK 250 μ M (péptido Cdc2), acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(22) LIMK1 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba LIMK1 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 0,6 mg/mL de cofilina, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de 35 incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(23) MAPK1 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba MAPK1 (h) (5-10 mU) con Tris 25 mM pH 7,5, EGTA 0,02 mM, péptido 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo,

(24) MEK1 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba MEK1 (h) (1-5 mU) con Tris 50 mM pH 7,5, EGTA 0,2 mM, β -mercaptoetanol al 0,1 %, Brij-35 al 0,01 %, MAPK2 (m) inactivo 1 μ M, acetato de Mg 10 mM y ATP frío (concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de MgATP. Despues de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se usan 5 μ L de esta mezcla de incubación para iniciar un ensayo de MAPK2 (m).

(25) Met (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Met (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKSPGEGYVNIEFG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Despues de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido

fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(26) MLCK (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba MLCK (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, CaCl_2 0,5 mM, 16 μ g/mL de calmodulina, KKLNRTLSFAEPG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox., 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

10

(27) PDGFR β (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PDGFR β (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, MnCl_2 10 mM, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %, a continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat A y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

15

(28) PhKy2 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PhKy2 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKLNRTLSFAEPG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

20

(29) Pim-1 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Pim-1 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKRNRTLTV 100 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

30

(30) PKA (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PKA (h) (5-10 mU) con 8 mM MOPS pH 7,0, EDTA 0,2 mM, LRRASLG 30 μ M (Kemptide), acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox., 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 50 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

35

(31) PKB β (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PKB β (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, GRPRTSSFAEGKK 30 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox., 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %, a continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

40

(32) PKC β I (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PKC β I (h) (5-10 mU) con HEPES 20 mM pH 7,4, Tritón X-100 al 0,03 %, CaCl_2 0,1 mM, 0,1 mg/mL de fosfatidilserina, 10 μ g/mL de diacilglicerol, 0,1 mg/mL de histona H1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

45

(33) PKC δ (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PKC δ (h) (5-10 mU) con HEPES 20 mM pH 7,4, Tritón X-100 al 0,03 %, 0,1 mg/mL de fosfatidilserina, 10 μ g/mL de diacilglicerol, ERMRPRKRQGSVRRRV 50 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo,

(34) PKG1 α (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PKG1 α (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, cGMP 10 μ M, RRRRLSFAEPG 200 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(35) PKG1 β (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PKG1 β (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, cGMP 10 μ M, RRRRLSFAEPG 200 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(36) Ret (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Ret (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKSPGEYVNIEFG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(37) ROCK-I (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba ROCK-I (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KEAKEKRQEIQAKRRRLSSLRASTSKGGSQK 30 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo,

(38) Rsk2 (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Rsk2 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKKNRTLSVA 30 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(39) SAPK2a (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba SAPK2a (h) (5-10 mU) con Tris 25 mM pH 7,5, EGTA 0,02 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(40) SRC (1-530) (h)

En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba SRC (1-530) (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, GGEEEEYFELVKKKK 500 mM, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación

durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(41) Syk (h)

5 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Syk (h) (5-10 mU) con Tris 50 mM pH 7,5, EGTA 0,1 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, β -mercaptoetanol al 0,1 %, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una mezcla MgATP. Despues de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat A y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

10

(42) Tie2 (h)

15 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba Tie2 (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, MnCl₂ 0,5 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat A y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

(43) TrkA (h)

20 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba TrkA (h) (5-10 mU) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, KKSPGEGYVMEFG 250 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

25

(44) PRAK (h)

30 En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incuba PRAK (h) (5-10 mU) con β -glicerofosfato de Na 50 mM pH 7,5, EGTA 0,1 mM, KKLRRTLSVA 30 μ M, acetato de Mg 10 mM y [γ -³³P-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). Se inicia la reacción con la adición de la mezcla MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción con la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3 %, a continuación se vierten 10 μ L de la reacción en Filtermat P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 50 mM y una vez en metanol antes de secado y recuento por centelleo.

35 Los valores de Cl₅₀ para péptidos inhibidores se determinaron usando el servicio Cl₅₀ Profiler Express de Millipore. El valor de Cl₅₀ se estimó a partir de una curva de 10 puntos de diluciones semilogarítmicas. Para los péptidos en los que se probó la especificidad, se escogió la concentración de los péptidos que inhibieron aproximadamente el 95 % de la actividad de MK2 para obtener el perfil frente a una batería de cinasas relacionadas con MK2, la viabilidad celular o una enfermedad humana a partir del servicio MilliporeKinaseProfiler. En los dos ensayos se suministraron compuestos en sulfóxido de dimetilo (DMSO). Todas las medidas de la actividad de cinasa se realizaron por duplicado.

40 La **Figura 1** muestra curvas y valores de Cl₅₀ para variantes de péptidos inhibidores terapéuticos con el mismo PTD (YARAARGQARA) [SEQ ID NO: 37] en comparación con el péptido de PTD independiente YARAARGQARA [SEQ ID NO: 37] y el péptido de dominio terapéutico independiente KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30]. Todas las variantes de péptidos inhibidores terapéuticos mostraron valores de Cl₅₀ inferiores al péptido del dominio terapéutico KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30]. La sustitución de Asn por Ala y/o la sustitución de Gly por Ala produjeron cambios menores en los valores de Cl₅₀ para el péptido inhibidor terapéutico. La eliminación del Ala terminal proporcionó un aumento menor en el valor de Cl₅₀.

45

Ejemplo 4. Los PTD afectan a la potencia de los péptidos inhibidores terapéuticos

50 Los PTD mostraron diferente influencia en la potencia de los péptidos inhibidores terapéuticos. Cada uno de los PTD, cuando se combinó con su dominio terapéutico respectivo, proporcionó diferentes niveles de sinergia con el efecto inhibidor de los péptidos inhibidores terapéuticos. La **Figura 2** muestra curvas y valores de Cl₅₀ para variantes de péptidos inhibidores terapéuticos con el mismo dominio terapéutico (KALNRQLGVAA) [SEQ ID NO: 13] pero con diferentes PTD. El péptido inhibidor terapéutico que incorpora el péptido PTD WLRRRIKAWLRRRI [SEQ ID NO: 38] tenía un valor de Cl₅₀ inferior (más de 30 veces inferior) que el péptido inhibidor terapéutico que incorpora el péptido PTD YARAARGQARA [SEQ ID NO: 5].

Ejemplo 5. Las sustituciones de aminoácidos y PTD influyen en la especificidad de los péptidos inhibidores terapéuticos

Los péptidos inhibidores terapéuticos se sometieron a ensayo en relación con la actividad con respecto a las cinasas humanas relacionadas con MK2, viabilidad celular o enfermedad humana. Los ensayos se realizaron usando concentraciones de péptidos inhibidores terapéuticos que produjeron del 2 % al 8 % de actividad de MK2 normal. El error se comunica como la desviación típica entre 2 muestras, y "c" es AMPK de rata mientras que todas las demás cinasas usadas son cinasas humanas.

La **Tabla 3** y la **Tabla 4** muestran que los péptidos inhibidores terapéuticos con péptidos PTD FAKLAARLYR [SEQ ID NO: 35] y KAFAKLAARLYR [SEQ ID NO: 36] tenían una especificidad superior para ciertas cinasas que el péptido inhibidor terapéutico con el péptido PTD WLRRRIKAWLRRRI [SEQ ID NO: 34].

Tabla 3. Efecto de CPP en la especificidad del péptido inhibidor para MK2

Péptido	Concentración de ensayo [μ M]	Porcentaje de las 43 cinasas del ensayo con menos del 20 % de actividad	SEQ ID NO:
WLRRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA	30	47	14
FAKLAARLYRKALARQLGVAA	100	37	12
KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA	100	28	15

Tabla 4. Efecto de los péptidos de permeación celular en 43 cinasas diferentes.

Secuencia de péptidos	WLRRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO: 34)	FAKLAARLYR (SEQ ID NO: 35)	KAFAKLAARLYR (SEQ ID NO: 36)
Concentración:	30	100	100
Cinasa	Actividad de cinasa (%) (+ %DT)		
Abl	24(5)	41(2)	55(0)
AMPK ^c	36(4)	101(6)	118(7)
Aurora-A	46(1)	65(5)	60(1)
BTK	5(0)	19(1)	16(3)
CaMK1	9(1)	0(2)	0(2)
CDKI/ciclina B	17(0)	36(2)	55(3)
CHK1	31(5)	54(6)	68(0)
CKI δ	52(1)	99(3)	97(2)
CK2	114(4)	80(14)	79(12)
cKit	23(2)	42(3)	31(6)
DYRK2	93(8)	-11(1)	-10(0)
EGFR	10(4)	18(2)	16(1)
EphA2	38(4)	32(2)	22(7)
FGFRI	27(1)	22(1)	35(1)
Flt3	38(1)	14(0)	20(3)
GSK3 β	129(2)	188(4)	184(1)

IGF-1R	227(12)	69(4)	76(12)
IRAK4	12(1)	13(4)	16(2)
JAK3	85(5)	102(2)	91(8)
KDR	27(0)	78(6)	56(4)
Lck	130(1)	493(7)	847(29)
LIMK1	89(3)	92(2)	93(3)
MAPK1	121(5)	104(3)	108(1)
MEK1	14(2)	68(2)	66(0)
Met	30(1)	17(3)	22(3)
MLCK	4(1)	1(1)	2(0)
PDGFR β	42(4)	92(4)	66(8)
PhK γ 2	15(0)	20(0)	27(3)
Pim-1	5(1)	1(0)	1(2)
PKA	80(1)	76(8)	103(1)
PKB β	18(2)	16(5)	28(4)
PKC β 1	8(4)	73(0)	23(3)
PKC δ	11(0)	40(2)	24(3)
PKG1 α	1691)	12(2)	25(2)
PKG1 β	15(4)	15(1)	24(5)
Ret	11792)	89(0)	107(9)
ROCK-1	0(1)	25(2)	29(0)
Rsk2	14(5)	-1(1)	6(1)
SAPK2a	61(7)	30(6)	59(8)
Src (residuos 1-530)	6(1)	5(1)	3(0)
Syk	19(3)	38(9)	4(4)
Tie2	17(1)	0(0)	8(4)
TrkA	6(1)	17(2)	16(2)

Se sometieron a ensayo variantes de péptidos inhibidores terapéuticos adicionales en relación con la actividad con respecto a varias cinasas humanas representativas de varias familias de cinasas. Estas cinasas incluían: MK2; MK3; CaMKI (proteína-cinasa dependiente de calcio/calmodulina); PRAK (proteína-cinasa regulada/activada por p38, también conocida como proteína-cinasa activada por proteína-cinasa activada por mitógenos 5 (MAPKAPK5)); SAPK2a (p38 α); IRAK4 (cinasa asociada al receptor de IL-1 (IL-1R)); MLCK (cinasa de la cadena ligera de miosina); PKB β (proteína-cinasa B); PCK δ (proteína-cinasa C); y ROCK-I (serina/treonina-cinasa asociada a Rho). La concentración seleccionada produjo entre el 0-10 % de actividad MK2 basada en los datos de IC₅₀; YARAQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] puede estar a una concentración ligeramente superior, y toda la inhibición de cinasa puede ser mayor de lo esperado para la concentración enumerada; el error se refiere como la desviación típica entre 2 muestras.

5

10

La **Tabla 5** muestra las diferencias en especificidad entre péptidos inhibidores terapéuticos. Todos los péptidos inhibidores terapéuticos inhibieron MK2, MK3 y CaMKI. Las variantes de péptidos inhibidores terapéuticos con Ala sustituida por Asn mostraron mayor inhibición de CaMKI que MK2. Los péptidos inhibidores terapéuticos mostraron

un efecto mínimo en la actividad de PRAK. El péptido FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12] inhibió la actividad de SAPK2a. El péptido inhibidor terapéutico WLRIKAWLRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14] mostró la menor especificidad.

Tabla 5. Efecto de 5 variantes de péptidos inhibidores completos en 10 cinasas humanas.

Secuencia de péptidos	WLRIKAWLRIKALNRQLGVAA	FAKLAARLYR LARQLGVAA	KAFAKLAARLY RLARQLGVAA	YARAAARQAR ALARQLGVAA	YARAAAQAR ALNQLGVAA
SEQ ID NO:	14	39	40	41	42
Concentración de inhibidor de péptidos (μM)	30	100	100	300	300
Cinasa humana	Actividad de cinasa				
MK2	2(1)	5(2)	8(1)	-7(0)	10(3)
MK3	16(2)	10(1)	17(1)	5(1)	19(3)
CaMK1	9(1)	0(2)	0(2)	2(0)	8(1)
PRAK	67(9)	131(4)	148(4)	86(2)	81(3)
SAPK2a (p38α)	61(7)	30(6)	59(8)	66(3)	100(6)
IRAK4	12(1)	13(4)	16(2)	2392	68(3)
MLCK	4(1)	1(1)	2(0)	9(0)	66(9)
PKBβ	18(2)	16(5)	28(4)	17(2)	96(1)
PKCδ	11(0)	40(2)	24(3)	101(3)	105(2)
ROCK-1	0(1)	25(2)	29(0)	27(4)	95(7)

5

Las variantes de péptidos inhibidores terapéuticos que incorporan el péptido de PTD YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5], pero difieren en tener Ala sustituida por Asn en el dominio terapéutico, proporcionaron una mayor inhibición de las cinasas IRAK4, PKBβ, MLCK, ROCK-I y p38α que la variante con sustitución en Asn.

Ejemplo 6. Actividad del péptido inhibidor terapéutico con respecto a interleucina-6 y factor de necrosis tumoral-α

Se determinó la actividad de inhibición de los péptidos inhibidores terapéuticos con respecto a las citocinas Interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α).

6.1. Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron en resina Rink-amida o Knorr-amida (Synbiosci Corp., Livermore, CA) usando química Fmoc estándar en un Symphony® Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ). El reactivo de copulación para los aminoácidos (Synbiosci Corp.) fue HBTU/NMM (Anaspec, Freemont, CA/Sigma, St. Louis, MO). Después de la síntesis, el péptido se escindió de la resina con un cóctel basado en ácido trifluoroacético (95 % de ácido trifluoroacético, 2,5 % de agua, 1,25 % de triisopropilsilano y 1,25 % de etanodiol), se precipitó en éter y se recuperó por centrifugado. El péptido recuperado se secó al vacío, se resuspendió en agua purificada MilliQ y se purificó usando un FPLC (ÄKTA Explorer, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equipado con una columna de escala preparatoria a 22/250 C18 (Grace Davidson, Columbia, MD). Se usó un ácido acético para conseguir la purificación. El peso molecular deseado se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI de tiempo de vuelo usando un 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

6.2. Cultivo de células mesoteliales y tratamiento

Se adquirió una línea de células mesoteliales pleurales (CRL-9444) en American Type Culture Collection. Las células se mantuvieron y se sembraron en Medio 199 con BSS de Earle y L-glutamina 0,75 mM (Mediatech, Inc., Manassa, VA), 1,25 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma, St. Louis, MO), factor de crecimiento epidérmico 3,3 nM (MBL International, Woburn, MA), hidrocortisona 40 nM (Sigma), insulina 870 nM (MBL International), HEPES 20 mM

(Sigma), mezcla de elementos traza B (Mediatech, Inc.), suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Hyclone, Waltham, MA) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Mediatech, Inc.). Antes de tratar las células con péptidos inhibidores terapéuticos, se dejó que las células se aclimataran en medio libre de suero que consistía en sólo Medio 199 con BSS de Earle, L-glutamina, bicarbonato de sodio, HEPES, mezcla de elementos traza B y penicilina/estreptomicina (las mismas concentraciones y proveedores que antes) durante 24 horas antes del tratamiento con citocinas y/o péptidos inhibidores. Además siempre se añadieron simultáneamente citocinas con o sin péptido inhibidor o el inhibidor de proteína-cinasa disponible comercialmente Rottlerina ($IC_{50} = 5 \mu M$) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO)) en esta formulación del medio. Para todos los experimentos de cultivo de células, se usó la secuencia MK2 de péptido inhibidor MK2 de penetración celular YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11].

10 6.3. Análisis de interleucina-6

En general se cree que las citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son liberadas en la cavidad abdominal después de cirugía abdominal. Estas citocinas pueden desempeñar un papel en la formación/reformación de adherencias. Los estudios han referido que IL-1 y TNF- α son citocinas proinflamatorias importantes en la fase temprana de cicatrización de las heridas y son producidas por macrófagos activados en el líquido peritoneal, mientras que IL-6 se expresa por macrófagos activados y su producción es regulada por aumento por IL-1 durante el proceso inflamatorio. Además, los estudios han referido que IL-1 y TNF- α son potentes inductores de IL-6. Se cree que estas citocinas son importantes ya que interaccionan extensamente con la vía fibrinolítica y pueden contribuir directa o indirectamente a la remodelación de la matriz extracelular. Los estudios han referido que IL-1 β y TNF- α regulan por aumento el nivel de expresión de IL-6 e IL-8 en las células mesoteliales. Además, se ha demostrado que IL-1 β regula por aumento el nivel de expresión de TNF- α , IL-6 e IL-8 en los macrófagos. Por consiguiente, la cuantificación del nivel de expresión de IL-6 inducido por IL-1 β o TNF- α en las células mesoteliales o macrófagos se usa como un sistema de ensayo modelo para determinar la actividad de los péptidos inhibidores terapéuticos.

25 El análisis de IL-6 se realizó con un kit ELISA IL-6 (PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ). Brevemente, la placa se preparó del modo siguiente. El anticuerpo de captura (anti-hIL-6 de cabra purificado por afinidad de antígeno + 2,5 mg de D-manitol) se diluyó con solución salina con tampón de fosfato (PBS) a una concentración de 1 $\mu g/ml$ y se añadió a cada pocillo de la placa. La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación se aspiraron los pocillos para extraer el líquido, y se lavó 4 veces usando tampón de lavado (300 μl por pocillo del 0,05 % Tween-20 en PBS). Después del último lavado, se invirtió la placa para eliminar el tampón residual, y se realizó inmunotransferencia en una toalla de papel. Se añadió tampón de bloqueo (300 μl por pocillo de BSA al 1 % en PBS), se incubó la placa durante al menos 1 hora a temperatura ambiente, se aspiró y se lavó 4 veces.

30 Se prepararon patrones (de 2 ng/ml a cero) y muestras en diluyente, añadido inmediatamente a cada pocillo por triplicado, y se incubó a temperatura ambiente durante al menos 2 horas en un agitador de placa ajustado a 300 rpm. A continuación se aspiraron los pocillos, se lavaron 4 veces, se añadió anticuerpo de detección (anti-hIL-6 de cabra purificado por afinidad de antígeno biotinilado + 2,5 mg de D-manitol; 0,25 $\mu g/ml$) (100 μl) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placa ajustado a 300 rpm. Despues de la incubación, se aspiró la placa, se lavó 4 veces, se añadió conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (5,5 μl :10.994,5 μl de diluyente) (100 μl) a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placa ajustado a 300 rpm, se aspiró y se lavó 4 veces. A cada pocillo se le añadió a continuación 45 solución de sustrato líquido ABTS (Sigma) (100 μl). Se incubó la placa a temperatura ambiente para desarrollo del color en un agitador de placa ajustado a 300 rpm. Se midió la absorbancia a 405 nm y 650 nm (650 nm fue la corrección de longitud de onda restada de cada 405 nm de medida) usando un Spectramax M5 Microplate Reader (Molecular Devices) cada 5 minutos durante 50 minutos. Se usó tinción nuclear Hoeschst 33342 (Invitrogen) para cuantificar el número de células basándose en la cantidad de ADN. Todos los resultados se obtuvieron por triplicado y se normalizaron al número de células.

50 Los resultados se presentan en forma de media \pm desviación típica. Se usaron análisis ANOVA de una vía para determinar los aumentos o disminuciones estadísticamente significativos en los parámetros de interés. Se analizaron las diferencias significativas con comparaciones post hoc HSD de Tukey. En los análisis de citocinas se usó un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

50 6.4. Regulación de la expresión de IL-6 con inducción por IL-1 β

Se incubaron células mesoteliales con IL-1 β (1 ng/ml) (para inducir la expresión de IL-6) y/o diferentes concentraciones de péptido inhibidor terapéutico. Se introdujo el inhibidor de proteína-cinasa disponible comercialmente Rottlerina como inhibidor de MK2 y PRAK.

55 La Figura 7 muestra una representación gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml/ 10^5 células) con respecto al tiempo. Estos resultados muestran que el péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] inhibió la expresión de IL-6 inducida por IL-1 β en las células mesoteliales. Estos resultados muestran además que la máxima concentración del péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] (3 mM) y Rottlerina (1 μM) redujeron significativamente la expresión de IL-6 inducida por IL-1 β . Los resultados muestran también que se produce una reducción significativa de la expresión de IL-6 inducida por IL-1 β

por el péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] (3 mM) antes (en 6 horas) que la producida por Rottlerina (12 horas).

6.5. Regulación de la expresión de IL-6 con inducción por TNF- α

5 Se incubaron células mesoteliales con TNF- α (para inducir la expresión de IL-6) y/o diferentes concentraciones de un péptido inhibidor terapéutico (YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] o FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]). El inhibidor de proteína-cinasa disponible comercialmente Rottlerina se usó como inhibidor de MK2.

10 La **Figura 8** muestra una representación gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml/10⁵ células) con respecto al tiempo. Estos resultados muestran que los dos péptidos inhibidores terapéuticos redujeron el nivel de expresión de IL-6 inducida por TNF- α (1 ng/ml) y sugieren además que el efecto de los péptidos inhibidores terapéuticos puede ser dependiente de la dosis. Los resultados muestran también que el inhibidor de proteína-cinasa Rottlerina fue 15 ineficaz para reducir el nivel de expresión de IL-6 inducido por TNF- α (1 ng/ml).

15 La **Figura 9** muestra una representación gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml/10⁵ células) con respecto al tiempo. Estos resultados muestran que los dos péptidos inhibidores terapéuticos redujeron el nivel de expresión de IL-6 inducida por TNF- α (10 ng/ml) y sugieren además que el efecto de los péptidos inhibidores terapéuticos puede ser dependiente de la dosis. Los resultados muestran también que el inhibidor de proteína-cinasa Rottlerina tuvo como efecto inicialmente (de 6-12 horas) una reducción mínima del nivel de expresión de IL-6 inducido por TNF- α (10 ng/ml).

Ejemplo 7. Efecto de MK2i en la producción de IL-1 β

20 El efecto inhibidor de la proteína inhibidora terapéutica que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] en la producción de IL-1 β se estudió en las células neurales.

25 Se establecieron cultivos de astrocitos corticales primarios. Los astrocitos de rata primarios se aislaron a partir de cortezas de ratas Sprague Dawley en el día embrionario 18. Se aislaron las células siguiendo el protocolo Brain Bits sugerido y se cultivaron hasta confluencia en placas de Petri de polilisina (PDL) de 100 mm. Brevemente, las 30 cortezas de rata se trituraron con ayuda de una pipeta de 1 ml hasta que se dispersó la mayoría de las grandes piezas de la corteza. Después de dejar sedimentar fragmentos de tejido grandes, se recogió el sobrenadante, en un tubo cónico de 15 ml, y se sedimentó por centrifugado a 1.100 rpm durante 1 minuto. Se desecharó el sobrenadante resultante y se resuspendió el sedimento en medio neurobasal (suero de caballo al 10 %, glutamina 3 mM). A continuación se sembraron los astrocitos en las placas de Petri y se cultivaron hasta que fueron confluentes (80-95 %) después de lo cual se pasaron. Los astrocitos se pasaron 1:4, se cultivaron al 80-95 % de confluencia, y a 35 continuación se enjuagaron dos veces con PBS. Se aplicaron diferentes tipos de tratamiento a cada placa de Petri correspondiente durante 18-22 horas. Se obtuvo un total de 1 ml de medio (medio neurobasal con 10 % de suero de caballo, glutamina 3 mM) más tratamiento en cada placa de Petri. El control positivo comprendía el tratamiento de las células con TNF- α (5 ng/ml o 10 ng/ml); como control negativo, las células se expusieron a medio celular sin ninguno de los tratamientos. Los grupos de tratamiento consistieron en (i) MK2i 1 mM (péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]) con TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i 3 mM con TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i 1 mM con TNF- α (10 ng/ml de TNF- α); y (iv) MK2i 3 mM con TNF- α (10 ng/ml). Las citocinas con o sin péptido inhibidor terapéutico se añadieron siempre simultáneamente en esta formulación de medio.

40 Despues de 18-22 horas, se enjuagaron las células con PBS, se rasparon en un pequeño tubo de centrífuga usando un tampón de lisis (urea 8 M, CHAPS al 4 %, DTT 10 mM), y se desorganizó usando Disruptor Genie™ (Scientific Industries, Bohemia, NY) durante 2 horas. Se sedimentaron las células por centrifugado a 17 krpm durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante (lisado celular) y se cuantificó la concentración total de proteínas (Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL).

45 La **Figura 10** muestra una gráfica de la concentración media de IL-1 β (pg/ml) de cada grupo de tratamiento (i) MK2i 1 mM (péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]) con TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i 3 mM con TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i 1 mM con TNF- α (10 ng/ml); y (iv) MK2i 3 mM con TNF- α (10 ng/ml). Estos resultados muestran que TNF- α aumentó la concentración de IL-1 β , como se esperaba, y el péptido inhibidor terapéutico fue capaz de inhibir el nivel de expresión de IL-1 β en cultivos de astrocitos corticales primarios de rata de un modo dependiente de la dosis. Los resultados sugieren que el péptido inhibidor terapéutico limitará activamente 50 la cicatrización glial que se debe a una expresión inflamatoria de citocinas inducida.

Ejemplo 8. Efecto de inhibición de cinasa MAPKAP 2 (MK2i) en la producción de IL-6

55 El efecto inhibidor de la proteína inhibidora terapéutica que tiene la secuencia de aminoácidos YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] en la producción de IL-6 se estudió en un cultivo triple que consistía en neuronas, astrocitos y microglia. Se preparó el medio celular del modo siguiente. Brevemente, se añadió Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (6,68 g) y bicarbonato de sodio (1,85 g) a agua desionizada destilada (DDI) (500 ml); se filtró la suspensión esterilizada y, a continuación, se suplementó con penicilina/estreptomicina (500 μ l), suero bovino fetal (FBS) (50 ml) y suero humano (HS) (50 ml). Se añadió el medio

5 preparado (1 ml) al tejido, y se trituró el tejido 10 veces durante 30 segundos a través de una punta de pipeta estéril. Se filtró la suspensión celular a través de un filtro de nailon y se recogió. Se centrifugó la suspensión filtrada a 1.100 rpm durante 1 minuto y se resuspendió el sedimento. Se sembraron en placa células E18 (1×10^6 células/ml) para soportar la diferenciación en neuronas, astrocitos y microglia. Despues de una semana en cultivo, se fijaron algunas células y se sondeó la β -3 tubulina (un biomarcador de neuronas), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, un biomarcador para astrocitos) y molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1, un biomarcador para microglia) para validar la presencia de los tres tipos celulares. Los anticuerpos primarios usados incluían anti-Iba1 de conejo (1:200; Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA), anti-GFAP de pollo (1:200; Millipore Corp., Billerica, MA) y conjugado de anti- β -3-tubulina de ratón para Alexa Fluor 488 (1:200; Millipore Corp., Billerica, MA). Los anticuerpos secundarios incluían anti-conejo de cabra Alexa Fluor 633 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA) y anti-pollo de cabra Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA). Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El control positivo comprendía el tratamiento de las células con TNF- α (5 ng/ml o 10 ng/ml); como control negativo, se expusieron las células a medio celular sin ningún tratamiento. El grupo de tratamiento consistía en (i) MK2i 1 mM (péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]) con TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i 3 mM con TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i 1 mM con TNF- α (10 ng/ml TNF- α); y (iv) MK2i 3 mM con TNF- α (10 ng/ml). En esta formulación de medio se añadieron siempre citocinas con o sin péptido inhibidor terapéutico.

10

15

20 La Figura 11 muestra una gráfica de la concentración media de IL-6 (pg/ml) de cada grupo de tratamiento de (i) control negativo (sólo media); (ii) TNF- α (5 ng/ml); (iii) TNF- α (10 ng/ml); (iv) TNF- α (5 ng/ml) y MK2i (péptido inhibidor terapéutico YARAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] 1 mM); (v) TNF- α (10 ng/ml) y MK2i (1 mM); (vi) TNF- α (5 ng/ml) y MK2i (3 mM); y (vii) TNF- α (10 ng/ml) y MK2i (3 mM). Estos resultados muestran que TNF- α (5 ng/ml) aumentó el nivel de expresión de IL-6 en los cultivos celulares y que todos los cultivos celulares tratados con el péptido inhibidor terapéutico tenían niveles de expresión de IL-6 reducidos.

Lista de secuencias

25 <110> Panitch, Alyssa
Seal, Brandon

<120> Inhibidor de cinasas basado en péptidos de permeación celular

30 <130> 071415.010201

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> desconocido

40 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 1
Gly Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn
1 5 10

45 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> desconocido

<220>
<223> MAMÍFERO

55 <400> 2
Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 3
<211> 13

<212> PRT
<213> Desconocido

5 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 3
Lys Lys Ala Leu Arg Arg Gln Glu Ala Val Asp Ala Leu
1 5 10

10 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> desconocido

15 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 4
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

20 <210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

25 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 5
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

30 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido

35 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 6
Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
1 5 10

40 <210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido

45 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 7
Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Arg
1 5 10

50 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> desconocido

55 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 8
 Arg
 1 5

5 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> MAMÍFERO

<400> 9
 Ser Gly Trp Phe Arg Arg Trp Lys Lys
 1 5

15 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Desconocido

<220>
 <223> MAMÍFERO

25 <400> 10
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

30 <210> 11
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> MAMÍFERO

35 <400> 11
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala
 20

40 <210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> MAMÍFERO

45 <400> 12
 Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Ala
 50 20

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Desconocido

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 13
Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
1 5 10

5

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> Desconocido

10

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 14
Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Leu Asn
1 5 10 15

15

Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
20

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

20

<213> Desconocido

<220>

<223> MAMÍFERO

25

<400> 15

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala
1 5 10 15

Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
20

<210> 16

<211> 22

30

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> MAMÍFERO

35

<400> 16

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg
1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala
20

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> desconocido

40

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 17

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
1 5 10 15

Gln Leu Ala Val Ala
20

5 <210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 10 <220>
 <223> MAMÍFERO

 10 <400> 18
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Gly Val Ala
 20

15 <210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 20 <220>
 <223> MAMÍFERO
 20 <400> 19
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Ala Val Ala
 20

25 <210> 20
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 30 <220>
 <223> MAMÍFERO

 30 <400> 20
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Gly Val Ala
 20

35 <210> 21
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 40 <220>
 <223> MAMÍFERO

 40 <400> 21
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Gly Val Ala Ala
 20

45 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
<223> MAMÍFERO

5 <400> 22
Lys Ala Ala Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
1 5 10

10 <210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

15 <220>
<223> MAMÍFERO
<400> 23
Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
1 5 10

20 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

25 <220>
<223> MAMÍFERO
<400> 24
Lys Ala Leu Asn Ala Gln Leu Gly Val Ala Ala
1 5 10

30 <210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

35 <220>
<223> MAMÍFERO

40 <400> 25
Lys Ala Leu Asn Arg Ala Leu Gly Val Ala Ala
1 5 10

45 <210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> desconocido

50 <220>
<223> MAMÍFERO

<400> 26
Lys Ala Leu Asn Arg Gln Ala Gly Val Ala Ala
1 5 10

55 <210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> MAMÍFERO

60 <400> 27

Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Ala Val Ala Ala
 1 5 10

5 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> MAMÍFERO

15 <400> 28
 Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Ala Ala Ala
 1 5 10

20 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

25 <220>
 <223> MAMÍFERO

30 <400> 29
 Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala
 1 5 10

35 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40 <220>
 <223> MAMÍFERO

45 <400> 30
 Lys Lys Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
 1 5 10

50 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Desconocido

55 <220>
 <223> MAMÍFERO

60 <400> 31
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5 10

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> MAMÍFERO

55 <400> 32
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5

60 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT

5 <213> desconocido
 <220>
 <223> MAMÍFERO
 10 <400> 33
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 15 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> desconocido
 20 <220>
 <223> MAMÍFERO
 <400> 34
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile
 1 5 10
 25 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> desconocido
 30 <220>
 <223> MAMÍFERO
 <400> 35
 Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg
 1 5 10
 35 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 40 <220>
 <223> MAMÍFERO
 <400> 36
 Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg
 1 5 10
 45 <210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> MAMÍFERO
 50 <400> 37
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gln Ala Arg Ala
 1 5 10
 55 <210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> MAMÍFERO
 60 <400> 38

Trp Leu Arg Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile
 1 5 10

<210> 39

<211> 19

5 <212> PRT

<213> desconocido

<220>

<223> MAMÍFERO

10

<400> 39

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Leu Ala Arg Gln Leu Gly
 1 5 10 15

Val Ala Ala

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Desconocido

20

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 40

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Leu Ala Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Ala
 20

25

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Desconocido

30

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 41

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Leu Ala Arg Gln Leu
 1 5 10 15

Gly Val Ala Ala
 20

35

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Desconocido

40

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 42

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Leu Asn Arg Gln Leu
 1 5 10 15

Gly Val Ala Ala
 20

45

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> MAMÍFERO

5

<400> 43

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala
1 5 10

<210> 44

10

<211> 14

<212> PRT

<213> Desconocido

15

<220>

<223> MAMÍFERO

<400> 44

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición inhibidora de cinasa para su uso en un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio con una fisiopatología que comprende la expresión inflamatoria de citocinas, comprendiendo la composición:

5 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor terapéutico, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido inhibidor terapéutico inhibe al menos una enzima cinasa;

en donde el péptido inhibidor terapéutico comprende un primer dominio y un segundo dominio;

en donde el primer dominio comprende un dominio de transducción de proteína y está situado proximal al segundo dominio, consistiendo el dominio de transducción de proteína en la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYR (SEQ ID NO: 35) o KAFAKLAARLYR (SEQ ID NO: 36);

10 en donde el segundo dominio comprende un dominio terapéutico y está situado proximal al primer dominio, consistiendo el dominio terapéutico en la secuencia de aminoácidos KALARQLGVAA (SEQ ID NO: 23), y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende una solución acuosa estéril,

en donde la composición reduce directa o indirectamente la expresión de al menos una citocina inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en IL-6 y TNF- α .

15 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el péptido inhibidor terapéutico tiene la secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 12).

3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el péptido inhibidor terapéutico tiene la secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 15).

20 4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido inhibidor terapéutico es un péptido aislado.

5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un conservante.

25 6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en asma, espondilitis anquilosante, diabetes tipo I, síndrome de Guillain-Barré, lupus, psoriasis, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, vasculitis, vasculitis de hipersensibilidad, shock endotóxico, pancreatitis, enfermedad inflamatoria localizada, ateroesclerosis, enfermedad de Alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenosis, reestenosis, leiomioma, espasmo del músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, bradicardia, hipertensión, hipertrofia cardíaca, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, hipertensión pulmonar, toxemia del embarazo, enfermedad de Raynaud, uremia hemolítica, fisura anal, acalasia, impotencia, migraña, vasculopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardio aturdió, disfunción diastólica, glosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteopenia, artritis degenerativa, septicemia, cirrosis, fibrosis intersticial, colitis, apendicitis, gastritis, laringitis, meningitis, otitis, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, síndrome cardiometabólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis quística del páncreas y los pulmones, fibrosis en el punto de inyección, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis nefrógena sistémica, cáncer de mama, cáncer de próstata y disfunción de las células epiteliales.

30 7. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el péptido inhibidor terapéutico es sintético.

40 8. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la enzima cinasa es una o más proteínas cinasas activadas por proteína-cinasa activada por mitógenos 2 (MK2), proteínas cinasas activadas por proteína-cinasa activada por mitógenos 3 (MK3), proteína-cinasa dependiente de Ca2+/calmodulina 1 (CaMK1).

45 9. La composición según la reivindicación 1, en donde la enzima cinasa se selecciona del grupo que consiste en proteína-cinasa regulada/activada por p38 (PRAK (MK5)), proteína-cinasa activada por estrés 2a (SAPK2a; p38alpha), cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK4), cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), proteína-cinasa B (PKBbeta), proteína-cinasa C (PKCdelta) y serina/treonina-cinasa asociada a Rho (ROCK1).

10. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición está dispuesta sobre o dentro de un dispositivo biomédico.

11. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición está formulada para administración parenteral.

50 12. La composición para su uso según la reivindicación 2, en donde el péptido inhibidor terapéutico consiste en SEQ ID NO: 12 e inhibe directa o indirectamente la expresión de IL-6.

FIG. 1

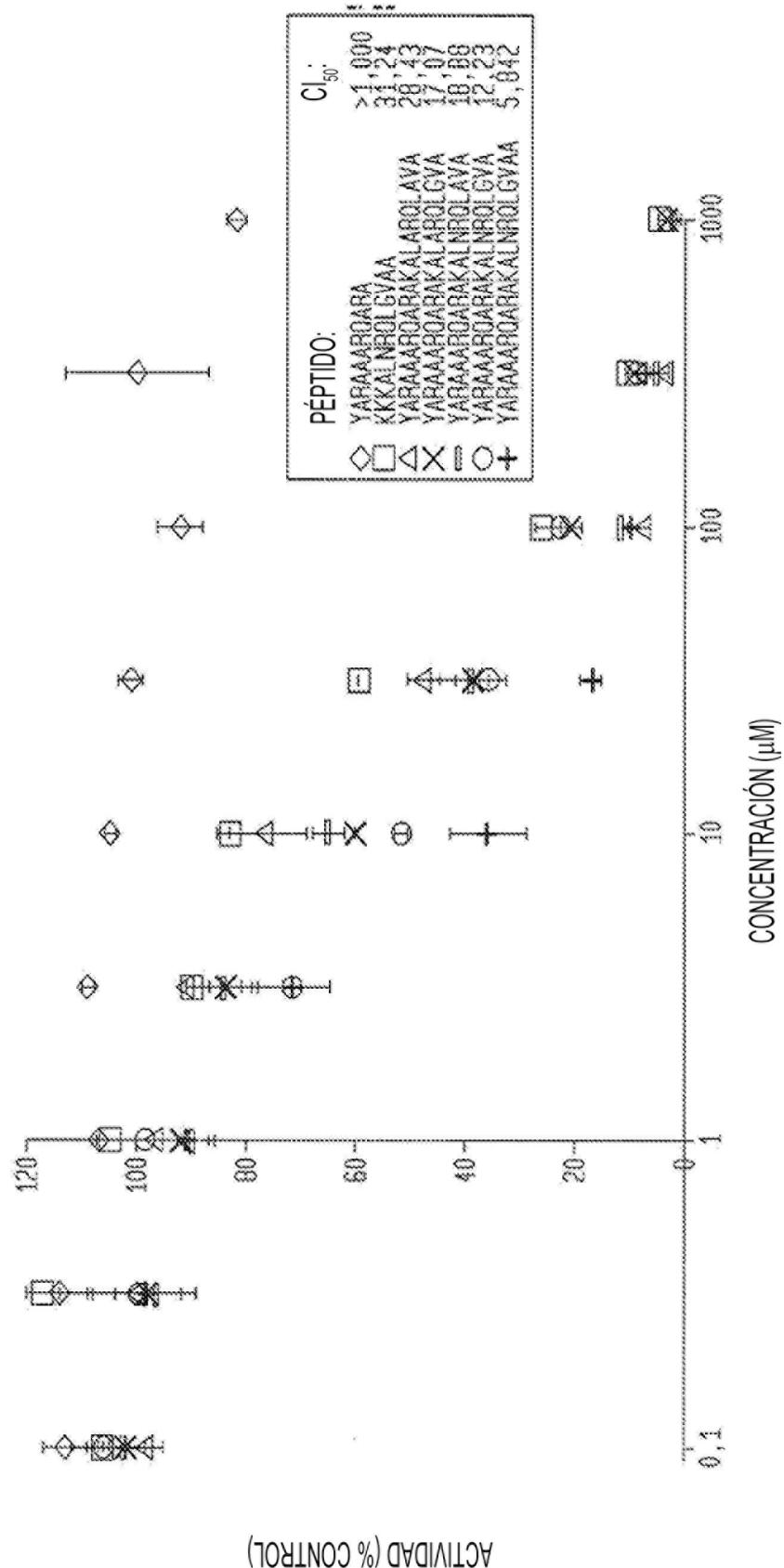


FIG. 2

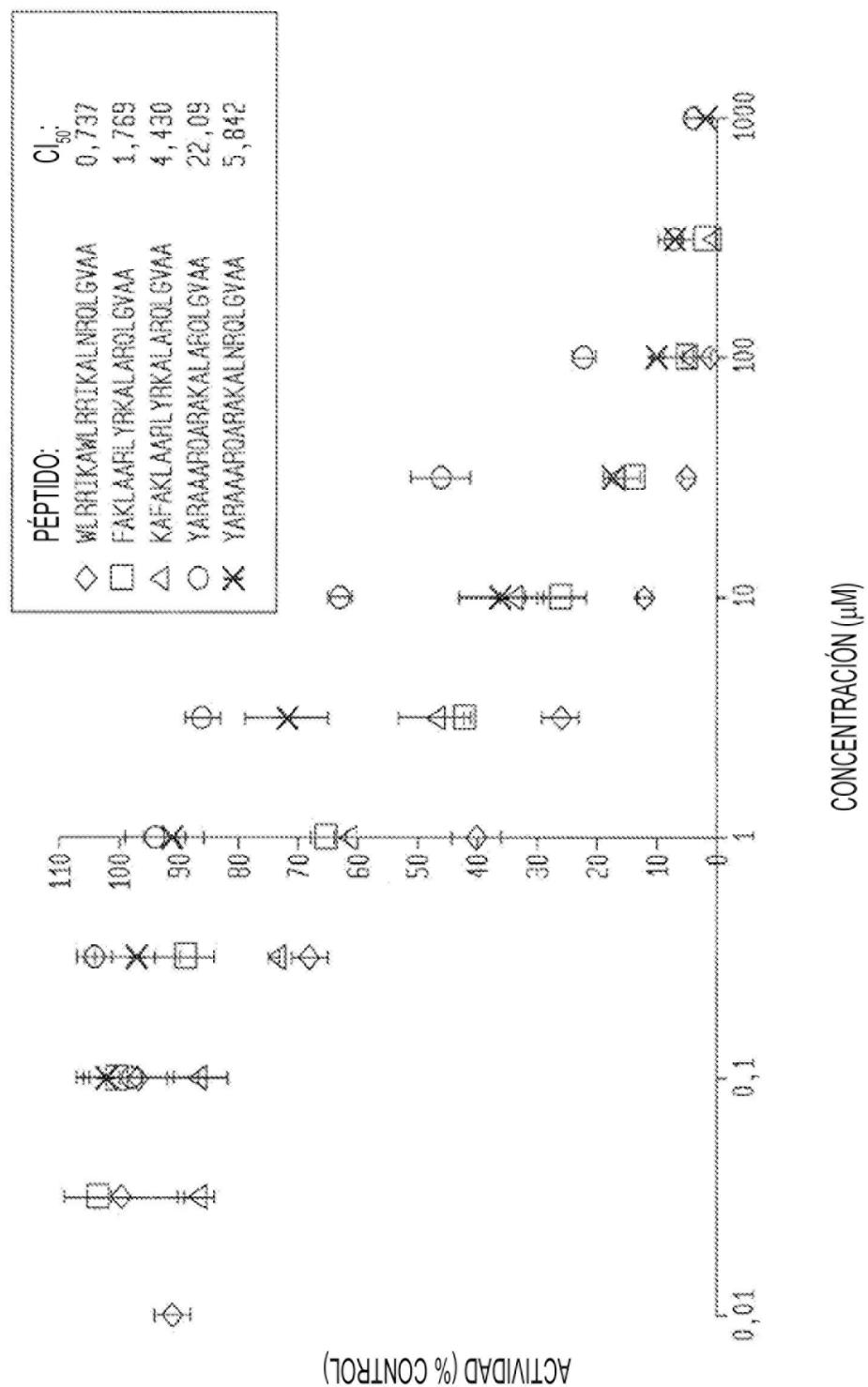


FIG. 3

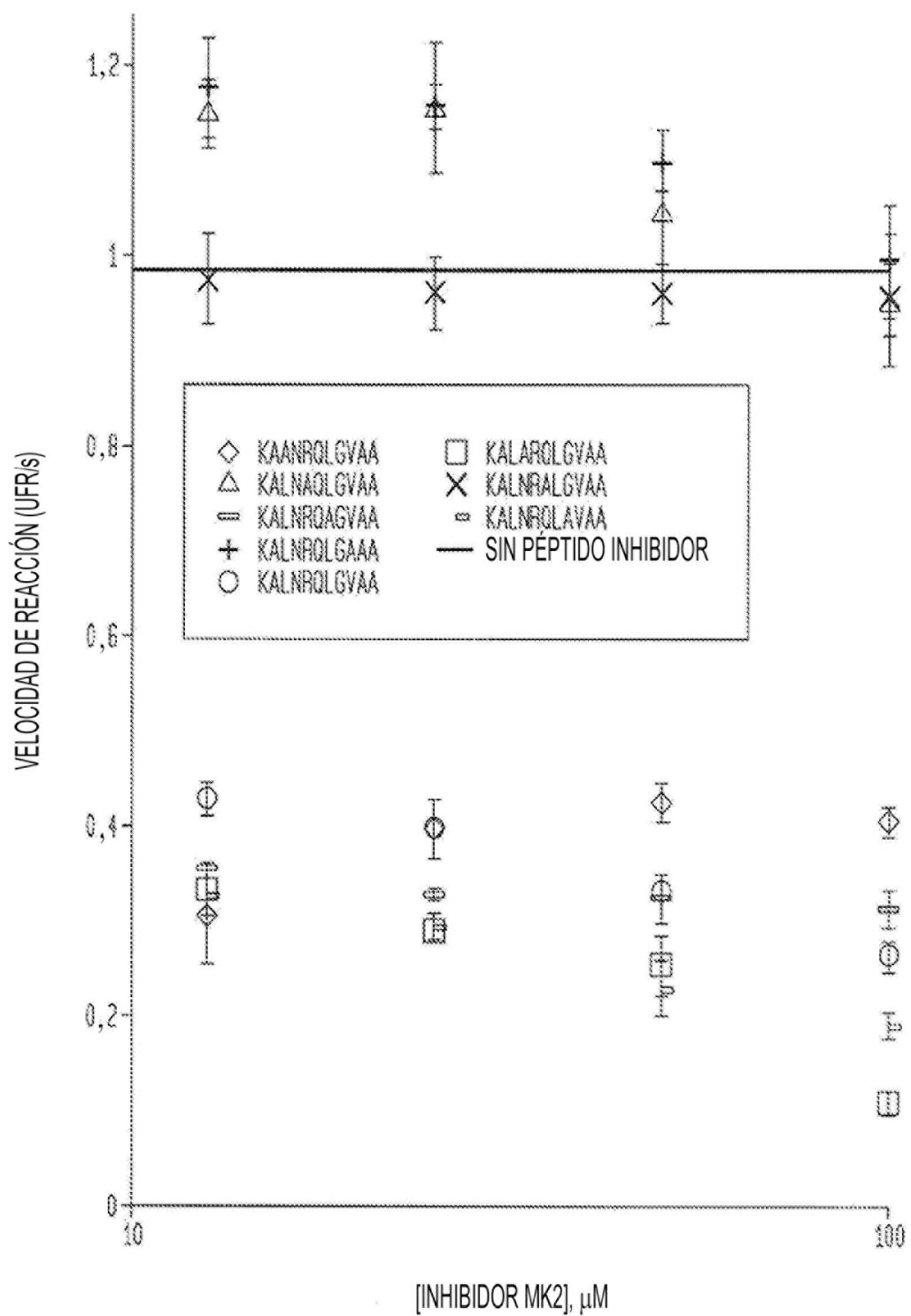


FIG. 4

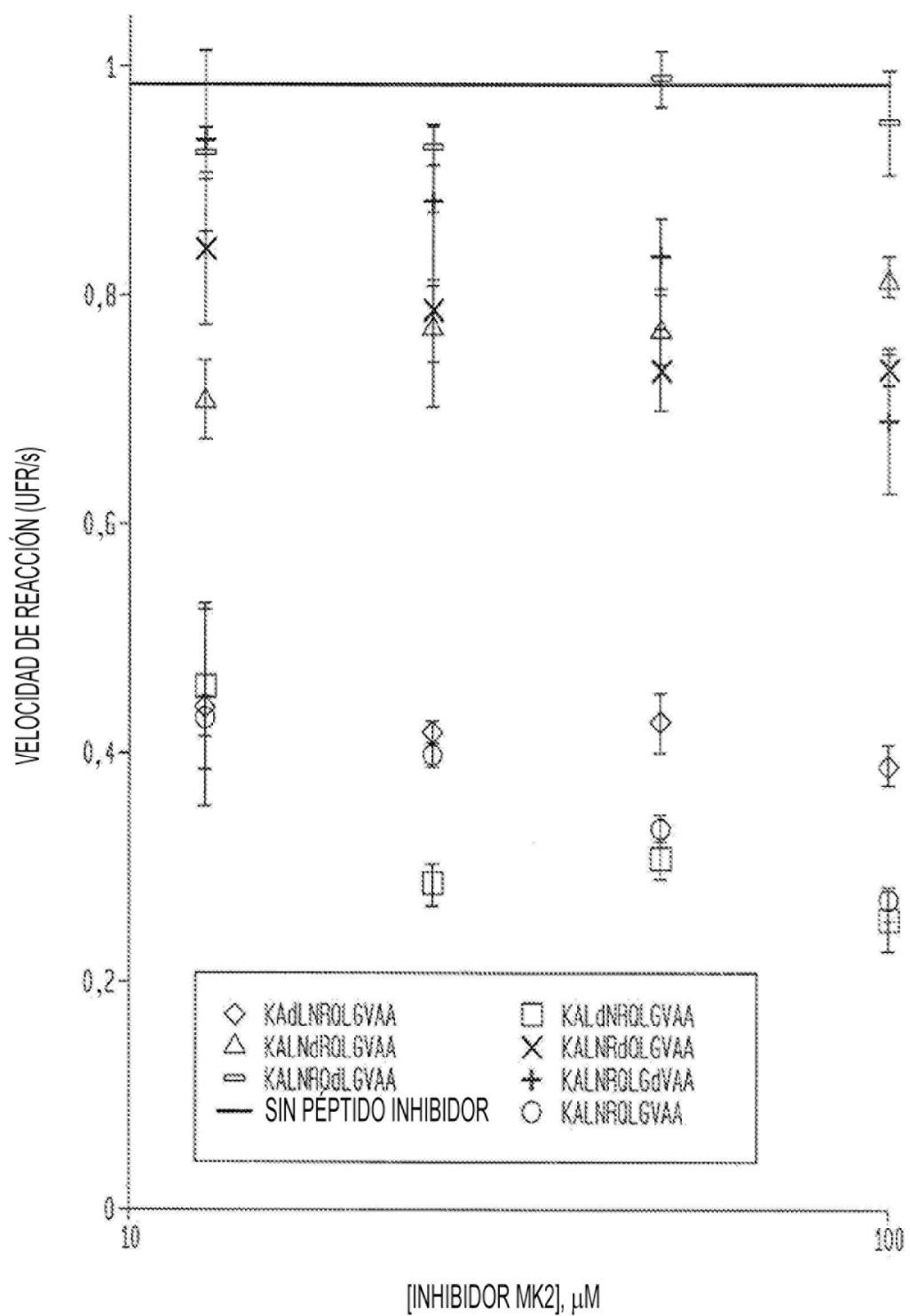


FIG. 5

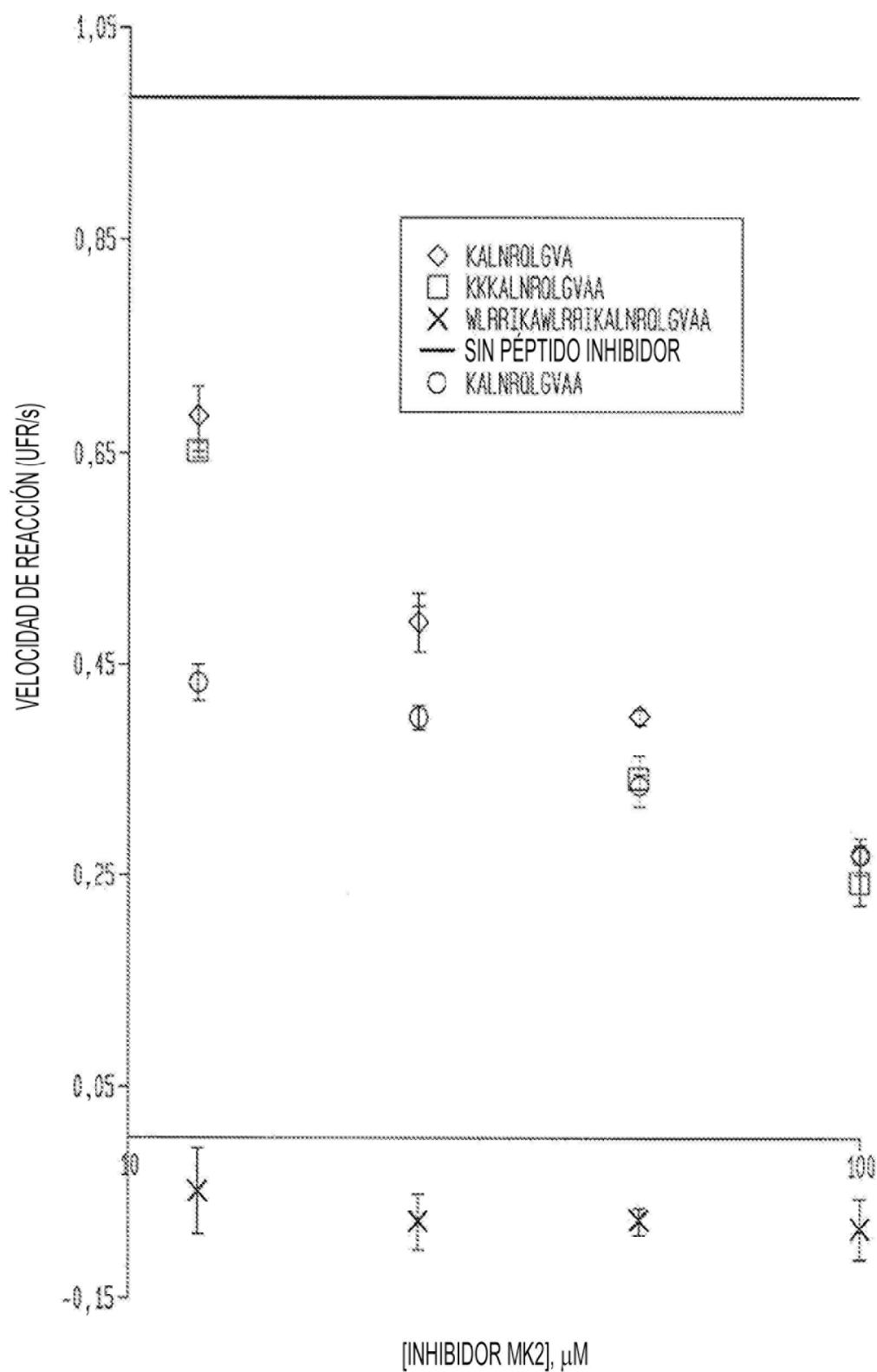


FIG. 6

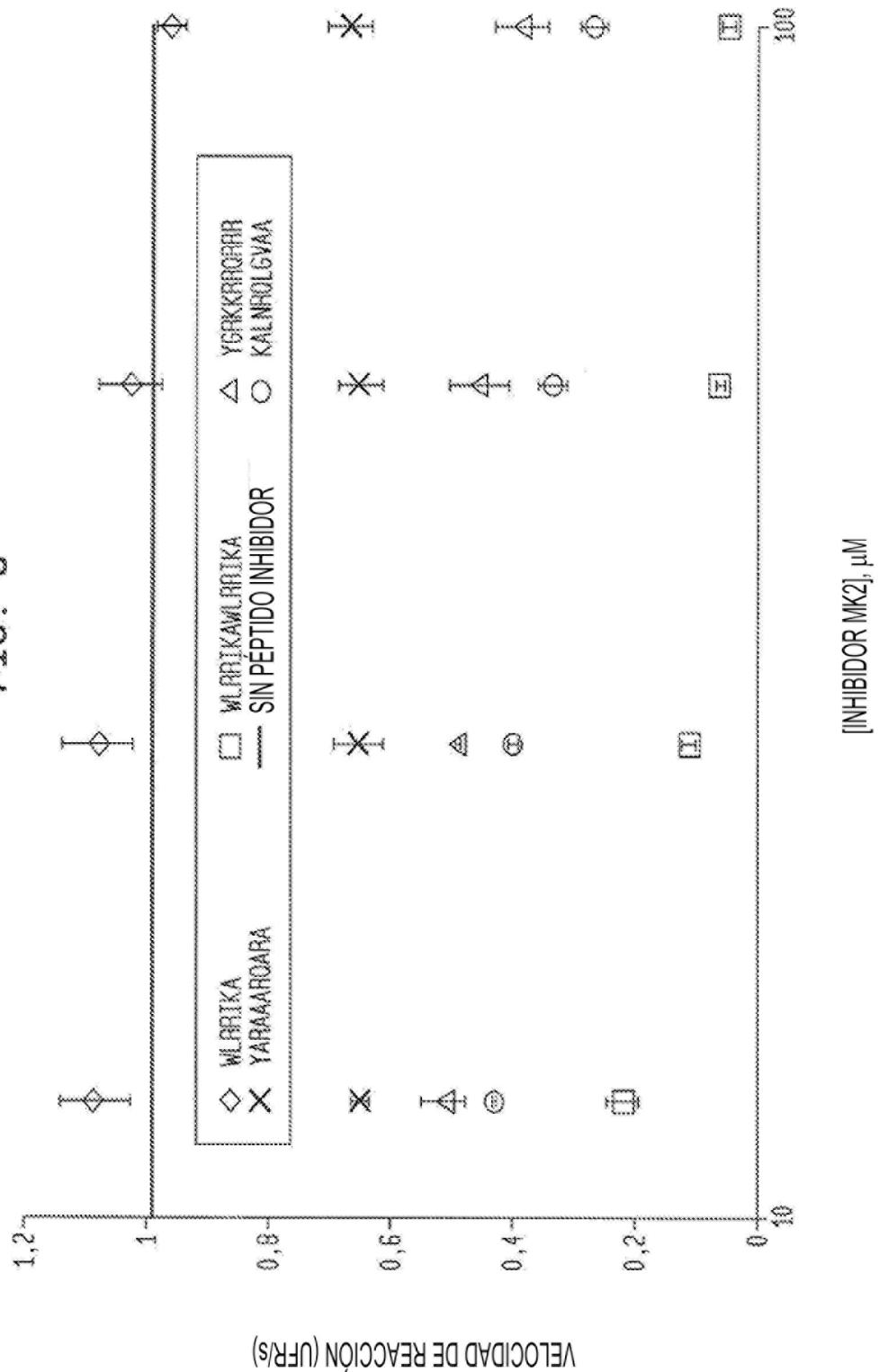


FIG. 7

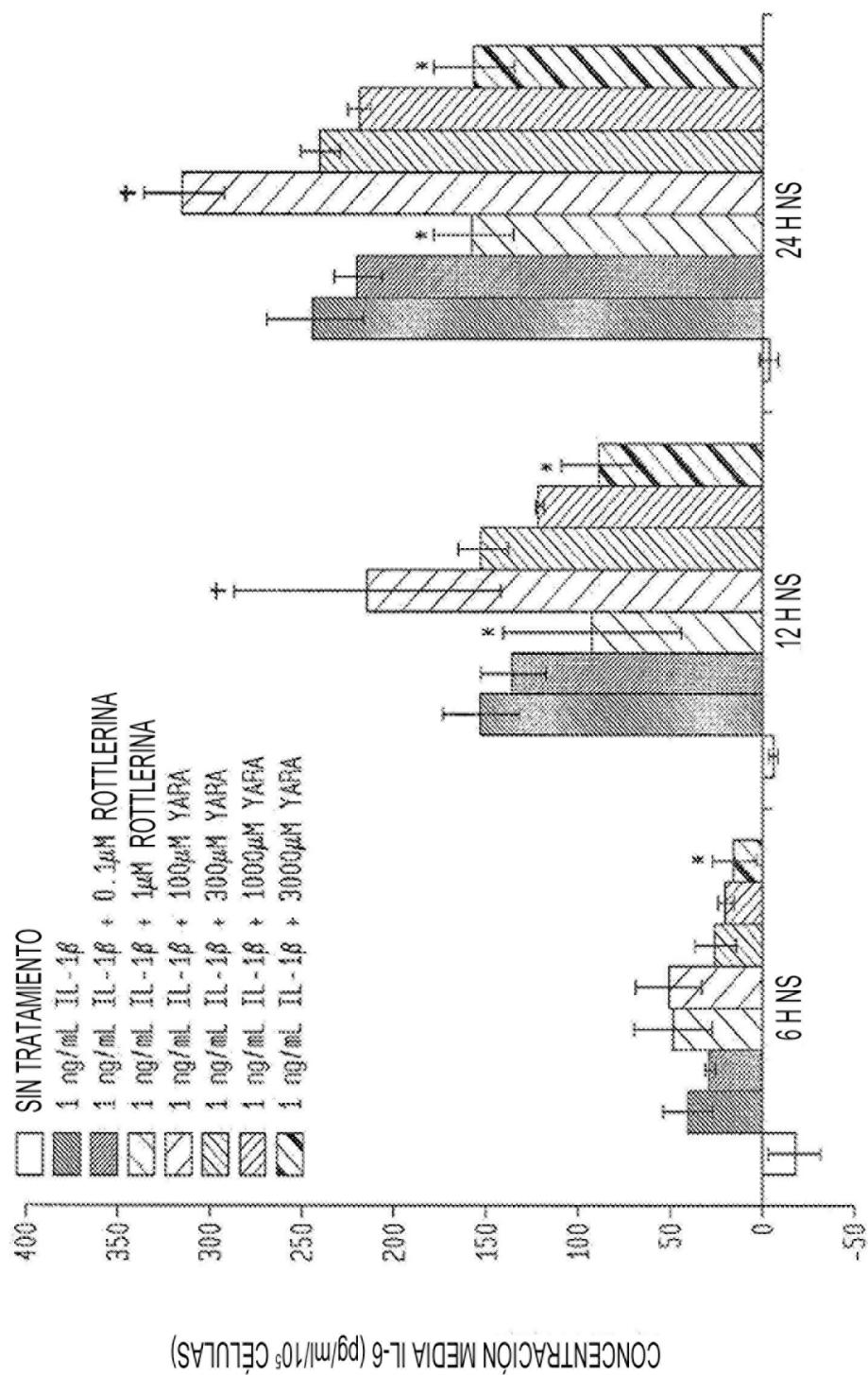


FIG. 8

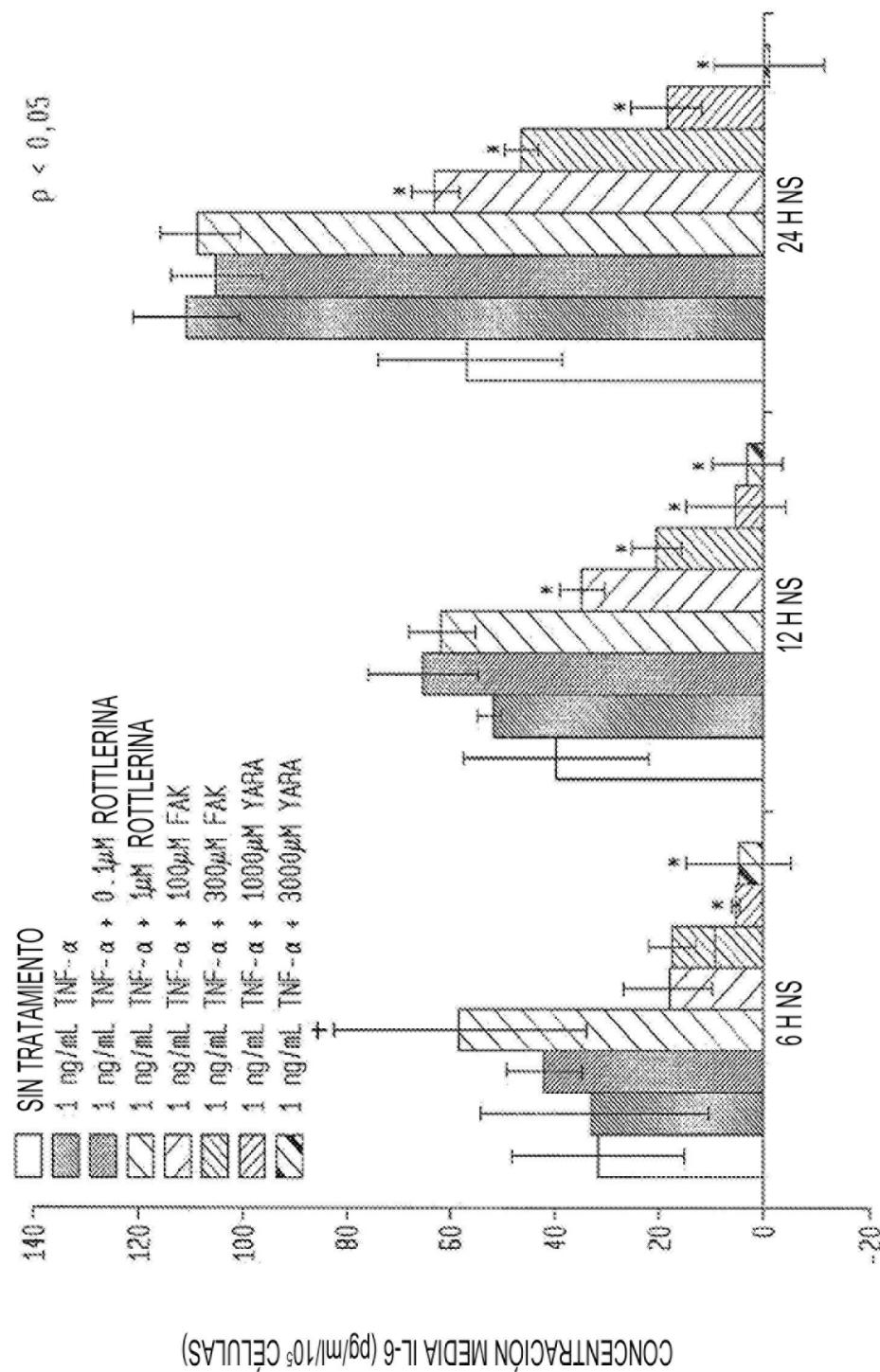


FIG. 9

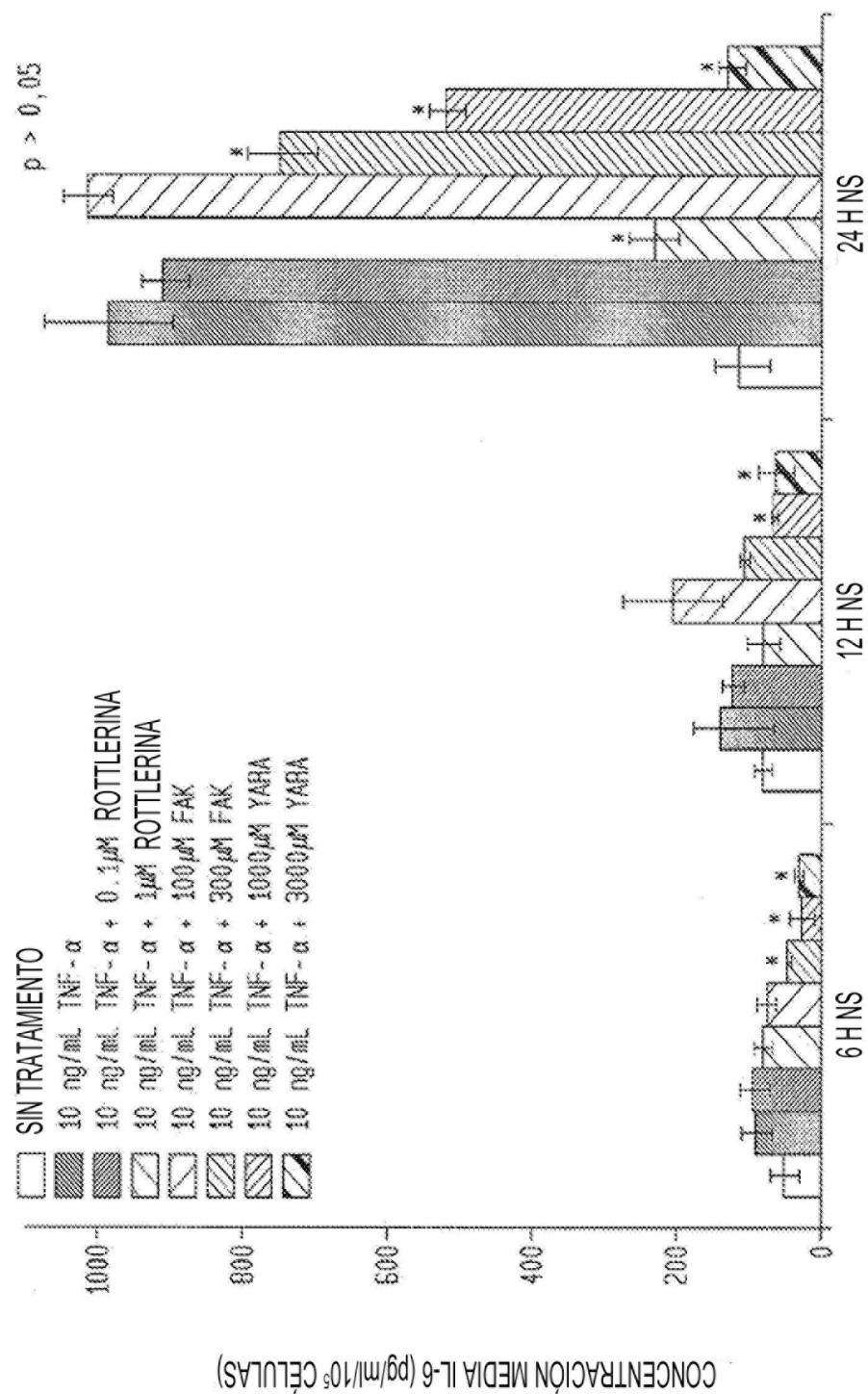


FIG. 10

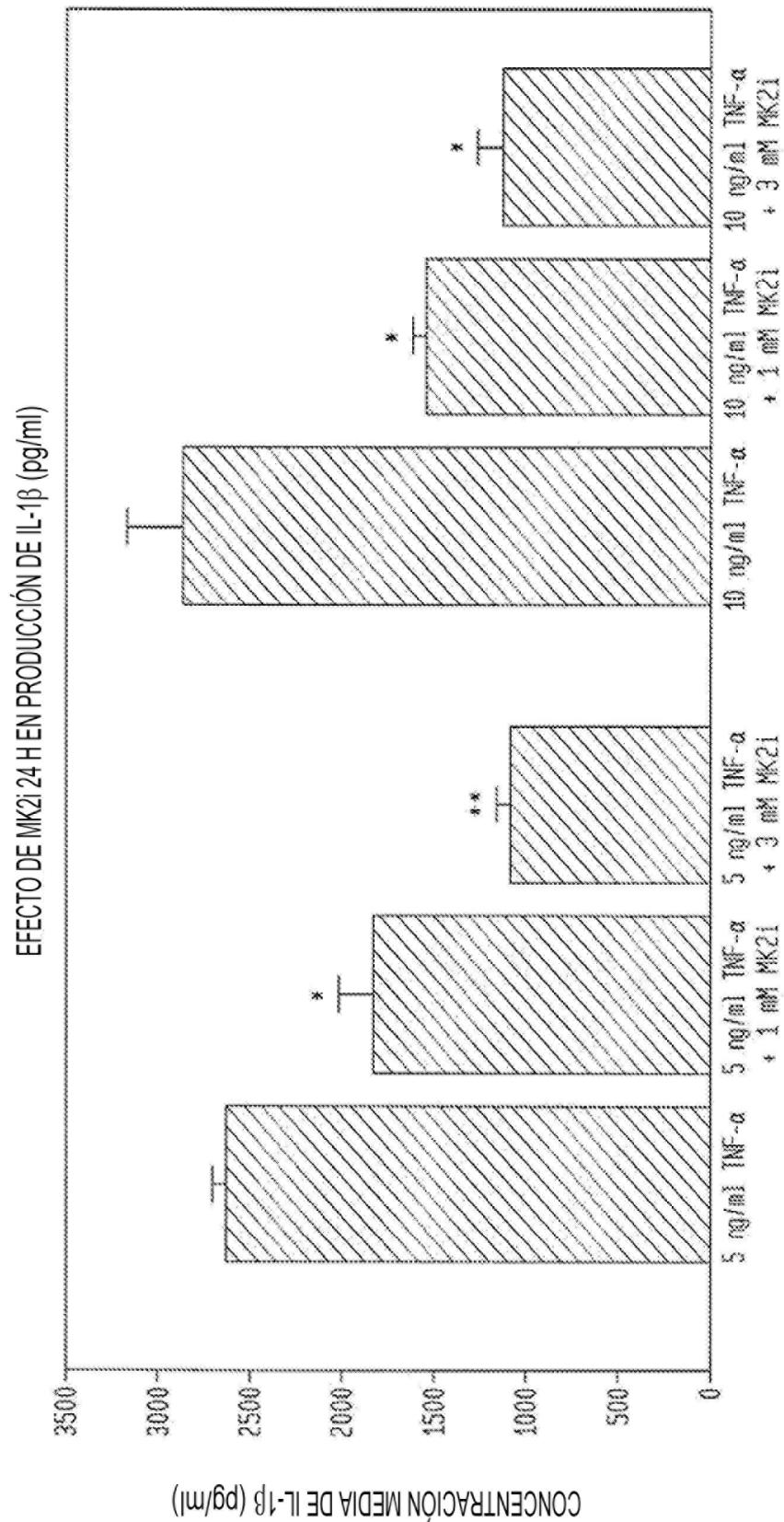


FIG. 11

EFECTO DE INHIBICIÓN DE CINASA MAPKAP 2 (MK2) EN PRODUCCIÓN DE IL-6

