(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 745 566**

(51) Int. CI.:

A61K 47/64 (2007.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2014 PCT/IB2014/002029**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15025217**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2014 E 14838596 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3007729**

(54) Título: **Estructura, fabricación y usos de péptidos que pueden penetrar en las células derivados de seres humanos conjugados con péptidos de carga biológicamente activos específicos**

(30) Prioridad:

11.06.2013 US 201361833819 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2020

(73) Titular/es:

PORTAGE PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Viking House, Nelson Street, Douglas
Isle Of Man IM1 2AH, VG

(72) Inventor/es:

LITTMAN, BRUCE H.;
THOMPSON, JOHN F. y
MARCOUX, FRANK W.

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Estructura, fabricación y usos de péptidos que pueden penetrar en las células derivados de seres humanos conjugados con péptidos de carga biológicamente activos específicos

Campo técnico

Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren generalmente a composiciones y métodos para tratar una variedad de afecciones o enfermedades a través de la administración de productos conjugados de péptidos que pueden penetrar en las células, particularmente, pero no exclusivamente, en forma de una proteína de fusión o complejo de proteína/ácido nucleico que utilizan péptidos derivados de las secuencias de aminoácidos del homeodominio codificadas por genes del homeodominio humano (HOX) y otros genes humanos que contienen un homeodominio con propiedades de permeabilización celular. Más concretamente, las realizaciones se refieren a un sistema de suministro que comprende un homeodominio humano o variante o porción del mismo, conectado a uno o más péptidos o proteínas funcionales o reguladores. Estos péptidos facilitan la entrada en los tejidos, las células y el núcleo de las células, permitiendo así que la proteína de fusión o el producto conjugado que contiene una segunda región biológicamente activa o "carga" alcance su sitio de acción con fines terapéuticos.

Antecedentes

En enfermedades con manifestaciones debidas a una función genética aberrante o una función deficiente, los genes se pueden regular mediante el suministro directo de moléculas biológicamente activas, tales como ácidos nucleicos, péptidos y proteínas, a sus sitios de acción intracelulares e intranucleares para influir en la expresión génica directamente o indirectamente a través de la interferencia con la transcripción, la traducción o la producción y la acción del factor de transcripción y también se pueden remplazar los productos proteicos ausentes o defectuosos para proporcionar este tipo de moléculas en individuos con mutaciones somáticas o de la línea germinal. El reemplazo directo de proteínas biológicamente importantes en individuos genéticamente deficientes se ve obstaculizado tanto por (i) la incapacidad de estas proteínas para alcanzar sitios intracelulares y sitios tisulares tales como el sistema nervioso central (SNC) donde normalmente funcionan y (ii) por la inmunogenicidad de estas proteínas. Los métodos para facilitar la entrada celular de proteínas comprenden la conjugación de una carga a péptidos que penetran en la célula, como se analiza de manera ilustrativa en F. Milletti "Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape" Drug Discovery Today 17(15/16):850-860, 2012.

Compendio

Las realizaciones descritas en la presente memoria junto con una gama de modificaciones proporcionan composiciones para productos conjugados, que incluyen proteínas de fusión, y métodos para utilizarlos para el tratamiento de una variedad de afecciones. Los productos conjugados o proteínas de fusión incorporan una secuencia o variante de 60 aminoácidos derivada del gen HOX humano, u otra secuencia del homeodominio humano o variante o porción de la misma para translocar moléculas funcionales y reguladoras, que no están naturalmente asociadas con el homeodominio humano o variante o porción del mismo, a través de las membranas celulares y nucleares a sus sitios de acción previstos sin provocar una respuesta inmunitaria no deseada que pueda reducir la exposición y/o efectividad del producto conjugado, o que pueda producir un evento clínico adverso. Adicionalmente, tales productos conjugados y proteínas de fusión también permiten la entrada al SNC al facilitar el paso a través de la barrera hematoencefálica y después la entrada a las células del SNC, tales como la microglia y las neuronas; también permiten la participación de estas moléculas funcionales o reguladoras en sus dianas intracitoplásmicas e intranucleares. La capacidad de suministrar directamente a una célula (i) el producto de expresión de un gen de interés o (ii) nuevas moléculas capaces de regular la función del gen, tiene una amplia aplicabilidad en el campo médico.

Además de facilitar el suministro de moléculas biológicamente activas a dianas intracelulares e intranucleares locales (tópicas) y sistémicas, las secuencias peptídicas de los genes HOX humanos también facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica, proporcionando así la exposición intracelular del SNC a las moléculas que contienen estas secuencias de genes HOX. Aprovechando la aplicación de la tecnología de suministro de tratamientos a través de lo que actualmente son barreras para el suministro de fármacos (tales como la barrera hematoencefálica), la administración sistémica puede elegir como diana los cánceres del sistema nervioso central mediante el suministro de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de tales aplicaciones son péptidos derivados del gen HOX conjugados con adriamicina, doxorrubicina o anticuerpos monoclonales dirigidos a dianas de células cancerosas tales como Her2 (p. ej., trastuzumab) para el tratamiento del cáncer de mama positivo para Her2 con metástasis cerebral. Además, los agentes antibacterianos y antivirales que de otro modo no alcanzan niveles terapéuticos en el SNC pueden atravesar la barrera hematoencefálica y tratar satisfactoriamente las infecciones intracelulares y extracelulares bacterianas y virales del SNC en modelos animales.

En una realización, el producto conjugado comprende una primera región, que tiene una secuencia descrita en SEQ

ID NO: 1 o 2 conjugada con una segunda región no asociada naturalmente con la primera región. La segunda región puede ser un polipéptido que tiene una secuencia establecida en uno cualquiera de SEQ ID NO: 20, 23, 26, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69 y 72 o una variante o variante o porción de la misma. La primera región comprende una estructura de homeodominio humano. La segunda región comprende un polipéptido o proteína funcionales o reguladores o una molécula pequeña farmacológicamente activa no asociada de forma natural con la primera región o comprende un ácido nucleico funcional o regulador o un ácido péptido nucleico no asociado naturalmente con la primera región.

Otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

El producto conjugado puede comprender:

(a) una primera región que comprende un dominio de 60 aminoácidos o una porción variante del mismo de uno de los dos genes HOX, HOX C12 y HOX D12; y
(b) una segunda región no asociada naturalmente con la primera región; y en donde al menos la primera región no está desnaturalizada.

Según una realización, la segunda región puede comprender un ácido nucleico. Este puede estar asociado a través de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen específica conocida como "reacción de clic" entre los grupos azida y alquino y se emplea para la síntesis de productos conjugados de péptido-oligonucleótido. Alternativamente, esta realización se puede ver como un complejo de proteína/ácido nucleico en la que la segunda región puede comprender un dominio de unión a ácido nucleico, capaz de unirse a ácidos nucleicos como parte del complejo.

Según otra realización, la primera y segunda regiones se asocian a través de la reacción de cicloadición 1,3- dipolar de Huisgen específica (es decir, 'reacción de clic'), en donde los oligonucleótidos actúan como miARN o antagonistas de miARN para afectar a la expresión génica. Estos oligonucleótidos pueden comprender ADN, ARN, ANB (ácido nucleico bloqueado), PNA (ácido péptido nucleico) u otros ácidos nucleicos.

Según una realización adicional, la primera y segunda regiones están conectadas a través de enlaces peptídicos convencionales en donde las nucleobases están ancladas a una cadena principal peptídica en lugar de a una cadena principal de fosfodiéster. Algunas o todas estas nucleobases son capaces de hibridar con otros ácidos nucleicos en la célula y afectar a la expresión génica. Estas nucleobases pueden ser PNA, γPNA o contener otras cadenas laterales con propiedades similares.

En otra realización más, los péptidos o los productos conjugados de péptido-ácido nucleico se pueden utilizar para afectar a la actividad de los miARN, que incluyen, pero no se limitan a, suscitar un efecto antagónico sobre miARN-132 para inhibir la ruta Ras y el cáncer, suscitar efecto antagónico sobre miR-21 para inhibir el cáncer o la ruta de NF-κB y la inflamación, o afectando a la función de otros miARN y rutas que puedan tener efectos perjudiciales y/o no deseables sobre la salud.

Según una realización adicional, el producto conjugado está en forma de una proteína de fusión. En esta realización, la segunda región es una proteína funcional o reguladora.

En otra realización, un producto conjugado puede comprender:

(a) una primera región que comprende un homeodominio humano con capacidades de permeabilización celular vinculadas a
(b) una segunda región no asociada naturalmente con la primera región que comprende una proteína tal como una enzima funcional.

En otra realización, una composición comprende un producto conjugado a proteína de fusión que puede adoptar cualquiera de las siguientes formas: una composición inhalable; una gota para los ojos u otra composición oftálmica para uso local o inyectable; un enema; una composición tópica; o una composición inyectable, que incluye un implante inyectable para liberación sostenida.

Se describe un método que comprende etapas que permiten que un producto conjugado o proteína de fusión que contienen uno o más péptidos o proteínas biológicamente activos se transloque a las células del SNC.

Se describen métodos para prevenir la inmunogenicidad de proteínas antigénicas de otro modo suministradas en forma de productos conjugados o proteínas de fusión a sus sitios de acción citosólicos o nucleares previstos.

Estas y otras realizaciones se describirán con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un homeodominio HOX C12 humano de 60 aminoácidos ilustrativo (primera región) (SEQ ID NO: 1) o una variante o porción del mismo en el extremo N terminal de un péptido de Carga.

La FIG. 2 muestra un péptido de carga ilustrativo (segunda región) en el extremo N-terminal del homeodominio HOX D12 humano de 60 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) o una variante o porción del mismo.

La FIG. 3a muestra un homeodominio HOX D12 humano de 60 aminoácidos ilustrativo (primera región) o una variante o porción del mismo en su extremo C terminal (SEQ ID NO: 107-108, respectivamente en orden de aparición) con péptidos de Carga (segunda y tercera regiones), donde la tercera región se puede utilizar para dirigir la estructura completa a tipos de tejidos o células específicos.

La FIG. 3b muestra un homeodominio HOX D12 humano de 60 aminoácidos ilustrativo (primera región) o una variante o porción del mismo en su extremo N terminal (SEQ ID NO: 107-108, respectivamente en orden de aparición) con péptidos de Carga (segunda y tercera regiones), donde la tercera región se puede utilizar para dirigir la estructura completa a tipos de tejidos o células específicos.

La FIG. 4 muestra un homeodominio HOX C12 humano de 60 aminoácidos ilustrativo (primera región) o una variante o porción del mismo (SEC ID NO: 109-110, respectivamente en orden de aparición) en el extremo N terminal de un péptido de Carga (segunda región), y una cola de His conjugada con el extremo C terminal a través del conector GS (SEQ ID NO: 111).

La FIG. 5 muestra un homeodominio HOX D12 humano de 60 aminoácidos ilustrativo (primera región) o una variante o porción del mismo (SEQ ID NO: 112 y 108, respectivamente en orden de aparición) en el extremo N terminal del péptido de Carga NBD (segunda región), y una cola de His conjugada con el extremo C terminal a través del conector GS (SEQ ID NO: 111).

La FIG. 6 muestra una secuencia ilustrativa para el plásmido pJ411:129925, que muestra un líder de 6 HIS (SEQ ID NO: 80), con una secuencia de transición de SAA seguida del sitio de escisión TEV (ENLYFQS) (SEQ ID NO: 81) para producir SEQ ID NO: 21 (también conocido como PPL-002) con el extremo N terminal apropiado. La Figura describe secuencias de ADN y proteínas de longitud completa como SEQ ID NO: 113 y 114, respectivamente.

La FIG. 7 muestra una secuencia ilustrativa para el plásmido pJ411:129926, que muestra un líder de 6 HIS (SEQ ID NO: 80), con una secuencia de transición de SAA seguida por el sitio de escisión TEV (ENLYFQS) (SEQ ID NO: 81) para producir SEQ ID NO: 22 (también denominado PPL-003) con el extremo N terminal apropiado. La Figura describe secuencias de ADN y proteínas de longitud completa como SEQ ID NO: 115 y 116, respectivamente.

La FIG. 8a muestra la inhibición de la activación de NF-κB en células RAW 264.7 murinas (estimulación con LPS de 4 horas). Las barras de error representan ETM.

La FIG. 8b muestra la inhibición de la activación de NF-κB en células 293 de Riñón Embrionario Humano (HEK) (estimulación con TNF-α de 4 horas). Las barras de error representan ETM.

La FIG. 9 muestra la inhibición de la activación de NF-κB estimuladas por TNF-α en Células Informadoras de Luciferasa NF-κB de HEK 293 por péptidos que pueden penetrar en las células que contienen la Carga de NBD. La FIG. 10: Cronología para determinar la actividad *in vivo* de péptidos que pueden penetrar en las células que contienen carga NBD: Los ratones se pretrataron con péptidos, se sensibilizaron mediante inyección de lipopolisacárido (LPS) y se tomaron muestras de sangre para el análisis de citocinas en los momentos indicados.

La FIG. 11a muestra la respuesta de TNF-α después de la inyección de LPS y el pretratamiento con péptido o dexametasona (Dex). Cada punto de datos representa el valor de un solo ratón.

La FIG. 11b muestra la respuesta de IP-10 después de la inyección de LPS y el pretratamiento con péptido o dexametasona (Dex). Cada punto de datos representa el valor de un solo ratón.

La FIG. 12 muestra la respuesta de IL-10 después de la inyección de LPS y el pretratamiento con péptido o dexametasona (Dex). Cada punto de datos representa el valor de un solo ratón.

La FIG. 13 muestra la concentración de PPL-003 en plasma después de la dosificación a 500, 1000 y 2000 microgramos.

La FIG. 14 muestra PPL-003 C_{max} en plasma por dosis, mostrando el promedio y la mediana a C_{max} (30 min.)
Las FIG. 15a y 15b muestran la respuesta de la proteína A amiloide (SAA) a las 2 horas de la sensibilización con LPS con pretratamiento de 2000 microgramos de PPL-003 a los 0, 30 y 60 minutos antes de la estimulación con LPS. Las barras de error representan ETM en la FIG. 15a y los puntos de datos en la FIG. 15b son ratones individuales, las líneas horizontales son valores de la mediana.

Las FIG. 16a y 16b muestran la respuesta de la proteína A amiloide (SAA) a LPS después del pretratamiento con PPL-003 a dosis de 500, 1000 y 2000 microgramos. Las barras de error representan ETM en la FIG. 16a, y los puntos de datos en la FIG. 16b son ratones individuales, las líneas horizontales son valores de la mediana. Los porcentajes son el porcentaje de inhibición con respecto al vehículo/LPS.

Las FIG. 17a y 17b muestran respuestas de IL-10 y Kc de ratón, respectivamente, después de una dosis de 2000 microgramos de PPL-003 a los 0, 30 y 60 minutos antes de la estimulación con LPS. Las barras de error representan ETM.

Las FIG. 18a y 18b muestran la inhibición de la respuesta de GM-CSF después de la dosis de 2000 microgramos de PPL-003 o PPL-004, respectivamente, a los 0, 30 y 60 minutos antes de la estimulación con LPS. Las barras de error representan ETM.

Descripción detallada

Los genes HOX humanos y otros genes codificantes de homeodominio son importantes en el desarrollo embrionario e incluyen pequeñas regiones homólogas al gen antenapedia (Antp) pero donde la mayoría de los aminoácidos se incluyen en secuencias exclusivamente humanas que facilitan su función. La secuencia de proteínas de antenapedia se caracteriza por la presencia de un motivo de 60 aminoácidos (homeodominio) que se une a elementos diana de ADN específicos. Se ha demostrado que el homeodominio Antp (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 7.968.512) y secuencias mucho más pequeñas del gen Antp facilitan la entrada de péptidos biológicamente activos ("carga") en los tejidos y las células para alcanzar su sitio de acción con fines terapéuticos.

Mientras que el homeodominio y las regiones más pequeñas de Antp se pueden utilizar para translocar proteínas, incluidas proteínas funcionales y reguladoras in vitro y en modelos animales, las secuencias peptídicas de los genes HOX humanos y ciertas otras secuencias de homeodominios humanos también pueden facilitar el transporte de moléculas biológicamente activas tales como péptidos, proteínas y nucleótidos a sus sitios de acción intracelular e intranuclear (i) sin provocar una respuesta inmunitaria no deseada que pueda reducir la exposición y/o la eficacia del producto conjugado o producir un evento adverso, y (ii) con mayor eficacia que los productos conjugados y proteínas de fusión de Antp. La capacidad para suministrar moléculas biológicamente activas, incluyendo el producto de expresión de un gen de interés directamente en una célula tiene una amplia aplicabilidad, particularmente en el campo médico. HOX y otros péptidos de homeodominios humanos también pueden translocar ácidos nucleicos. Esto es especialmente ventajoso para aplicaciones que utilizan un mecanismo de regulación génica.

Varias de las realizaciones descritas y sus modificaciones se refieren a nuevos productos conjugados, que pueden adoptar la forma de proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende un péptido de 60 aminoácidos o una variante o porción del mismo (**1** p.ej. como se muestra en la FIG. 1) derivado de genes HOX humanos o de otros genes humanos que contienen un homeodominio con propiedades de permeabilización celular, unidos (p. ej. **12** o **13** como se muestra en la FIG. 1) a una segunda región (**2**): al menos uno de los péptidos de "carga" biológicamente activos descritos en la presente memoria. La FIG. 1 muestra una realización que comprende el homeodominio HOX C12 humano de 60 aminoácidos ("primera región") (SEQ ID NO: 1) (**1**) conectado en su extremo C terminal (**4**) al extremo N terminal (**5**) de un péptido de carga biológicamente activo ("segunda región") (**2**). La FIG. 2 muestra una realización alternativa que comprende el homeodominio HOX D12 humano de 60 aminoácidos ("primera región") (SEQ ID NO: 2) (**1**) conectado en su extremo N terminal (**3**) al extremo C terminal (**6**) de un péptido de carga biológicamente activo ("segunda región"). (**2**) Las conexiones en ambas realizaciones pueden ser un enlace peptídico simple (**13**) o una secuencia conectora conocida en la técnica (**12**) siempre que la función de la proteína de fusión o el producto conjugado no se vea comprometida por su adición.

El término "comprometido" se refiere a la reducción de la función de las realizaciones del producto conjugado como se refleja en la reducción de la eficacia del tratamiento para cualquiera de los resultados discutidos en la presente memoria, p. ej., la función comprometida podría reflejarse en una reducción atenuada de la inmunogenicidad en comparación con la reducción de la inmunogenicidad observada con (1) el producto conjugado en forma de una proteína de fusión, o (2) el producto conjugado que comprende un conector alternativo.

Los péptidos de carga incluyen péptidos sintéticos pequeños y proteínas más grandes tales como anticuerpos o las regiones de unión de anticuerpos a las células con fines terapéuticos. (Schutze-Redelmeier M-P et al. "Introduction of exogenous antigens into the MHC class 1 processing and presentation pathway by Drosophila antennapedia

primes cytotoxic T cells in vivo. J. Imunol. 157(2):650-55, 15 de julio, 1996; M.J. May et al. Selective inhibition of NF-κB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IκB kinase complex" Science 289:1550-54, 1 de septiembre de 2000; I Strickland y S Ghosh. "Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation" Ann. Rheum. Dis. 65(Supl 3): iii75-iii82, 2006; C. Avignolo et al. "Internalization via Antennapedia protein transduction domain of an scFv antibody toward c-Myc protein" FASEB J. 22:1237-45, 2008).

Los términos "péptido o péptidos", "proteína o proteínas" y "polipéptido o polipéptidos" se utilizan como sinónimos.

El término "homeodominio humano" se refiere a (1) homeodominios derivados de HOX humanos tales como las secuencias de HOX C12 y HOX D12 mostradas en la Tabla 3 como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, o variantes o porciones de las mismas; y (2) cualquier otro homeodominio humano que tenga actividad de permeabilización celular, tal como SEQ ID NO: 3 a 19, o variantes o porciones de los mismos.

La frase "no asociado naturalmente con" significa que la secuencia completa del producto conjugado o la proteína de fusión no se encuentra en la naturaleza, y que la secuencia completa no está codificada por un solo gen que se encuentra en la naturaleza.

La frase "conectado operablemente" significa que la primera y la segunda regiones están unidas de tal manera que la segunda región se puede translocar en una membrana celular. Tal conexión se puede producir mediante la aplicación de métodos de química "clic" u otros métodos conocidos en la técnica o se puede incorporar como una proteína de fusión con un enlace peptídico entre regiones.

Un experto con conocimiento práctico normal de la biología molecular/biotecnología apreciaría que numerosas variaciones de las secuencias mostradas en las Tablas 3 y 4 se encontrarían dentro de las realizaciones descritas en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, la homología se refiere a la identidad o casi identidad de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Como se entiende en la técnica, se pueden producir emparejamientos erróneos de nucleótidos en la tercera base o base tambaleante en el codón sin causar sustituciones de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos traducida. Asimismo, se pueden tolerar modificaciones menores de nucleótidos (p. ej., sustituciones, inserciones o deleciones) en ciertas regiones de la secuencia del gen siempre que tales modificaciones den como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos que no alteren la funcionalidad del producto génico final. Los expertos en la técnica pueden identificar los homólogos de secuencias de ADN específicas utilizando la prueba de hibridación cruzada de ácidos nucleicos en condiciones de rigurosidad bien conocidas en la técnica (como describen Hames et al., Nucleic Acid Hybridisation, (1985) IRL Press, Oxford, Reino Unido). El grado de homología a menudo se mide en términos de porcentaje de identidad entre las secuencias comparadas.

El término "variante" se refiere a un polipéptido o proteína que difieren de un polipéptido o proteína de referencia, pero que conservan las propiedades esenciales. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. En general, las diferencias son limitadas, de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son muy similares en general (homólogas) y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más modificaciones (p. ej., sustituciones, adiciones y/o deleciones). Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que se produce de forma natural.

Se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de los polipéptidos y proteínas de esta descripción y aún dar como resultado una molécula que tenga características similares a las del polipéptido (p. ej., una sustitución conservativa de aminoácidos). Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida apreciable de actividad. Debido a que son la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido las que definen la actividad funcional biológica de ese polipéptido o proteína, ciertas sustituciones de secuencia de aminoácidos se pueden realizar en una secuencia de polipéptido o proteína y, sin embargo, obtener un polipéptido o proteína con propiedades similares.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su carácter hidrófobo, su carácter hidrófilo, su carga, su tamaño y similares. Las sustituciones ilustrativas que toman en consideración una o más de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a (residuo original: sustitución ilustrativa): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gln: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Trp: Tyr), (Tyr: Trp, Phe) y (Val: Ile, Leu). Las realizaciones de esta descripción, por lo tanto, consideran los equivalentes funcionales o biológicos de un polipéptido o proteína como se establece anteriormente. En particular, las realizaciones de los polipéptidos y proteínas pueden incluir variantes que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% con el polipéptido y la proteína de interés.

La "identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o proteínas, según se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también se refiere al grado de relación de secuencia entre polipéptidos o proteínas, según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. La "identidad" se puede calcular fácilmente mediante métodos bioinformáticos conocidos.

Primera región: La primera región de las realizaciones de productos conjugados o proteínas de fusión descritas puede comprender un péptido de 60 aminoácidos natural o sintético o variante o porción del mismo derivado del gen HOX C12 u HOX D12 o cualquier otro homeodominio humano que tenga actividad de permeabilización celular, tal como SEQ ID NO: 3 a 19, o variantes o porciones de los mismos.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de HOX C12 (SEQ ID NO: 1) es:
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR RMKKKRLL

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de HOX D12 (SEQ ID NO: 2) es:
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR RMKKKRVV

La descripción incluye una cualquiera de las 17 secuencias adicionales de homeodominios humanos de 60 aminoácidos o variantes o porciones de las mismas con propiedades permeabilizantes para permitir el suministro intracelular e intranuclear de productos conjugados y proteínas de fusión. Adicionalmente, cada una de estas secuencias adicionales proporciona la penetración en el SNC de moléculas que de otro modo no penetrarían en la barrera hematoencefálica. En la Tabla 3 se muestran ejemplos de secuencias de aminoácidos de estos productos conjugados y proteínas de fusión con los homeodominios HOX C12 y HOX D12 (SEQ ID NO: 21-22, 24-25, 27-28, 31-32, 34- 35, 37-38, 40-41, 43-44, 46-47, 49-50, 52-53, 55-56, 58-59, 61-62, 64-65, 67-68. 70-71, y 73-74, o variantes o porciones de las mismas. En la descripción, cualquiera de los otros homeodominios humanos o variantes o porciones de los mismos (SEQ ID NO: 3-19) y variaciones en estas secuencias pueden ser sustituidos por cualquiera de los homeodominios HOX C12 y D12. Cada una de las secuencias de homeodominios humanos es menos de 50% idéntica a la secuencia Antp de 60 aminoácidos y, por lo tanto, es estructuralmente distinta y tiene propiedades humanas únicas. Además, debido a que todas las secuencias de homeodominios que se muestran en la tabla son de origen humano, éstas no serán antigénicas en seres humanos. Cada una de las secuencias de homeodominios humanos se enumera a continuación en la Tabla 3 junto con la abreviatura del nombre del gen humano del que deriva (SEQ ID NO: 1 a 19). Las secuencias de carga pueden o no ser de origen humano, dependiendo de su función prevista.

Además, se pueden utilizar variantes sintéticas siempre que conserven la capacidad de translocarse en la membrana. Las variantes sintéticas generalmente diferirán de las proteínas naturales por sustitución, particularmente sustitución conservativa. La frase "cambios conservativos de aminoácidos" en la presente memoria significa el reemplazo de un aminoácido de uno de los grupos de aminoácidos, a saber, hidrófobo, polar, ácido o básico, por un aminoácido dentro del mismo grupo. Un ejemplo de tal cambio es el reemplazo de valina por metionina y viceversa. Se pueden ver otros ejemplos de sustituciones conservadoras con referencia a la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Sustituciones conservativas de aminoácidos.

ALIFÁTICO	No polar	Hueco	ILV
	Polar sin carga	CSTM	NQ
	Polar - cargado	DE	RK
AROMÁTICO			HFWY
OTRO			N

Tales variantes se pueden sintetizar directamente o preparar utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante tales como mutagénesis dirigida al sitio. Cuando se van a realizar inserciones, el ADN sintético que codifica la inserción junto con las regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia natural a ambos lados del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes que correspondan a sitios en la secuencia natural para que la secuencia se pueda cortar con la enzima o las enzimas apropiadas y el ADN sintético se ligue en el corte. El ADN se expresa a continuación para producir la proteína codificada. Estos métodos son solo ilustrativos de los numerosos mecanismos convencionales conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de ADN y también se pueden utilizar otros mecanismos conocidos. Las variantes que conservan al menos 50% de identidad de secuencia con las secuencias de 60 aminoácidos reivindicadas o variantes o porciones de las mismas derivadas de HOX-C12 y HOX-D12 probablemente mantendrán sus características de permeabilidad celular y conservarán sus características humanas dando como resultado un bajo potencial de inmunogenicidad. La capacidad de una secuencia HOX sintética o natural para translocarse en la membrana se puede someter a prueba mediante métodos de rutina conocidos en la técnica. Cualquier polinucleótido

que codifique el aminoácido de SEQ ID NO: 1-19 (Tabla 3) o una variante o porción del mismo se puede utilizar en una proteína de fusión o producto conjugado de la descripción.

Péptidos o proteínas de la segunda región: La segunda región de las realizaciones de productos conjugados o proteínas de fusión descritos puede comprender cualquier secuencia de péptido o proteína no asociada naturalmente con la primera región. El gen que codifica la primera región puede o no codificar también la segunda región. La segunda región también puede o no ser de la misma especie que la primera región, pero las regiones primera y segunda estarán presentes en las realizaciones de productos conjugados o proteínas de fusión de una manera diferente de la situación natural.

La segunda región de las realizaciones de proteína de fusión o producto conjugado puede ser un péptido o proteína de cualquier longitud siempre que sea biológicamente activo sobre su diana cuando se incluya en la proteína de fusión o producto conjugado.

Ácidos Nucleicos de la Segunda Región: La segunda región puede incluir cualquier ácido nucleico que pueda ser terapéuticamente activo. En una realización, el ácido nucleico puede ser ADN o ARN. En otra realización, el ácido nucleico es un oligonucleótido o un PNA.

En una realización, la segunda región puede incluir cualquier ácido péptido nucleico tal como PNA en los que las nucleobases reemplazan a los aminoácidos convencionales y la segunda región puede ser terapéuticamente activa, incluso actuando a través de antagonismo o activación de miARN, con el fin de *afectar a la expresión génica u otro* proceso biológico.

En otra realización, la segunda región puede incluir cualquier ácido péptido nucleico tal como PNA y en donde la segunda región puede ser terapéuticamente activa, lo que incluye la actuación a través del antagonismo o la activación de los ARNm, activando o reprimiendo el empalme o la traducción para afectar a la expresión génica u otro proceso biológico.

En ciertas realizaciones que comprenden un complejo de proteína/ácido nucleico, el complejo puede comprender adicionalmente un ácido nucleico o PNA como parte de la segunda región que, cuando está dentro de una célula, se une a un complejo RISC o un miARN. Por ejemplo, la unión al miARN miR132 puede inhibir el cáncer o NF-κB. Tal unión a una molécula de miARN puede formar un complejo estable, en donde la molécula de miARN se puede volver incapaz de afectar a la expresión de los genes como sería normalmente el caso de un miARN no unido.

En algunas realizaciones que comprenden un complejo de proteína/ácido nucleico, el complejo puede comprender adicionalmente un ácido nucleico o PNA como parte de la segunda región que, cuando está dentro de una célula, se une al ADN genómico. Por ejemplo, la unión al ADN en los sitios de unión al factor de transcripción puede evitar la unión y/o actividad del factor de transcripción y, por lo tanto, afectar a la transcripción génica.

En realizaciones adicionales que comprenden un complejo de proteína/ácido nucleico, el complejo puede comprender adicionalmente un ácido nucleico, LNA o PNA como parte de la segunda región que, cuando está dentro de una célula, se une a un ARNm. Por ejemplo, la unión al ARNm de DYRK1b puede regular por disminución la expresión y/o traducción de DYRK1b.

En realizaciones adicionales que comprenden un complejo de proteína/ácido nucleico, el complejo puede comprender adicionalmente un dominio de unión a ácido nucleico (o ADN) como parte de la segunda región. En una realización, el dominio de unión a ácido nucleico puede servir para mediar la interacción específica, de alta afinidad y no covalente del componente de proteína con el ácido nucleico o componente de PNA.

El dominio de unión a ácido nucleico puede ser un dominio de unión a ARN o ADN, p. ej., el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción, particularmente un factor de transcripción de levadura o humano. Por ejemplo, un dominio derivable de GAL4 media la unión selectiva de la proteína a la secuencia de ADN CGGAGGACAGTCCTCCG (SEQ ID NO: 82) (Cavey y col., J Mol Biol 209:423, 1989). Adicionalmente, el dominio de unión a ADN consiste en los aminoácidos 2 a 147 de GAL4. Un dominio de unión a ADN se puede unir a un ADN de hebra sencilla o de doble hebra en el segundo dominio.

Otras aplicaciones para las realizaciones de productos conjugados o proteínas de fusión descritas incluyen el desarrollo de medidas antibacterianas y antivirales. Por ejemplo, los péptidos que pueden penetrar en las células derivados del gen HOX o derivados de otros homeodominios humanos se pueden utilizar para el transporte en el citoplasma de células infectadas, anticuerpos recombinantes, moléculas efectoras de la inmunidad innata natural o moléculas de unión a ADN y que destruyen bacterias, parásitos o interfieren en una etapa crucial de la replicación bacteriana o viral.

Los péptidos y proteínas adecuados incluyen aquellos que tienen de aplicación terapéutica y/o de diagnóstico, tales como, pero no limitados a: citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas similares a inmunoglobulinas

modificadas por ingeniería genética, un anticuerpo de cadena sencilla, productos conjugados, enzimas, moléculas co-estimuladoras inmunitarias, moléculas inmunomoduladoras, ARN antisentido, un mutante transdominante negativo de una proteína diana, una toxina, tal como endotoxina A, colicina A, d-endotoxina, toxina diftérica, toxina de Bacillus anthracis, toxina de Cholera, toxina de Pertussis, toxinas de E. coli, Shigatoxina o una toxina tipo Shiga, una toxina condicional, un antígeno, una proteína supresora de tumores y factores de crecimiento, proteínas de membrana, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas antivirales y ribozimas, y derivados. Cuando se incluyen, tales secuencias codificantes pueden estar típicamente conectadas operativamente a un promotor adecuado, que puede ser un promotor que impulsa la expresión de una o varias ribozimas, o un promotor o promotores diferentes.

Una o más realizaciones pueden proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de un individuo mediante terapia génica en animales o seres humanos, en donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del producto conjugado o proteína de fusión. Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual y ésta variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo en particular.

Las realizaciones de la proteína de fusión o el producto conjugado que suministran una o más moléculas terapéuticas tales como genes o proteínas se pueden utilizar solas o combinadas con otros tratamientos o componentes del tratamiento. Las enfermedades que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a: cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades hereditarias, enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares, artritis, infecciones virales y bacterianas, y enfermedades del sistema inmunitario. Los genes terapéuticos adecuados incluyen aquellos que codifican proteínas supresoras de tumores, enzimas, enzimas activadoras de profármacos, moléculas inmunomoduladoras, anticuerpos, moléculas similares a inmunoglobulinas modificadas por ingeniería genética, productos conjugados, hormonas, proteínas de membrana, proteínas o péptidos vasoactivos, citocinas, quimiocinas, proteínas antivirales, ARN antisentido y ribozimas.

El producto conjugado también puede contener uno o más ácidos nucleicos que codifican citocinas o citocinas. Las citocinas y los factores de crecimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2. Exodus-2, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10 (Marshall 1998 Nature Biotechnology 16:129). Ligando FLT3 (Kimura et al. (1997), Fractalkina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-[beta] 1, insulina, IFN-[gamma], IGF-I IGF-II, IL-1 [alfa], IL-1 [beta], IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aa), IL-8 (77 aa), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina [alfa], Inhibina [beta], IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, leptina, LIF, linfotactina, sustancia inhibidora de Mullerian, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos (Marshall 1998 ibid), M-CSF, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP4, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MIG, MIP-1 [alfa], MIP-1 [beta], MIP-3 [alfa], MIP-3 [beta], MIP4, factor inhibidor de progenitores mieloides-1 (MPIF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento nervioso, [beta]-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 [alfa], SDF1 [beta], SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF-[alfa], TGF-[beta], TGF-[beta] 2, TGF-[beta] 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF-[alfa], TNF-[beta], TNF-1, TPO, VEGF, GCP-2 GRO/IMGSA, GRO-[beta], GRO-[gamma], HCC1 y 1-309. También se contempla que las citocinas homólogas y los factores de crecimiento se puedan utilizar como carga en sistemas animales adecuados para investigación o aplicaciones veterinarias.

Las realizaciones de proteínas de fusión o productos conjugados descritas pueden comprender otros dominios adecuados conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una señal de retención del retículo endoplásmico funciona afectando al enrutamiento intracelular del producto conjugado internalizado o complejo proteína/ácido nucleico. Una señal de retención endoplásmica adecuada puede ser una señal de retención del retículo endoplásmico de mamífero.

También puede estar presente un dominio de translocación que sirva para mejorar el escape de ácido nucleico o proteína del sistema de vesículas celulares y, por lo tanto, para aumentar la transferencia de ácido nucleico por esta ruta. Este dominio puede servir para reducir o evitar la degradación lisosómica después de la internalización de la proteína/ácido nucleico en la célula diana. Los dominios de translocación adecuados pueden derivar de toxinas, particularmente toxinas bacterianas, tales como exotoxina A, colicina A, d-endotoxina, toxina de difteria, toxina de Bacillus anthracis, toxina de Cholera, toxina de Pertussis, toxinas de toxina de E. coli, Shigatoxina o toxina tipo Shiga.

El primer dominio de unión se puede modificar para que se dirija a sitios de la célula distintos del núcleo.

Además, o alternativamente, puede estar presente un dominio de unión específico de célula diana que reconoce una estructura de la superficie celular, tal como una proteína receptora o antígeno de superficie en la célula diana.

El término "producto conjugado" o "productos conjugados" en la presente memoria comprende una categoría de estructuras, que incluyen proteínas de fusión, en las que la primera región, una secuencia de homeodominio humano de 60 aminoácidos o variante o porción de la misma, se conjuga directamente a través de un enlace

peptídico u otro tipo de enlace que incluye tanto enlaces covalentes como no covalentes. Los productos conjugados pueden incluir una región conectora que conecta la secuencia del homeodominio a una segunda región, un péptido o proteína funcionales o reguladores (péptido "de carga") que no está naturalmente asociado con la primera región. Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de conectores (secuencias de conexión cortas) conocidos en la técnica para formar el producto conjugado, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida por su adición. Por lo tanto, se habilita la translocación de la segunda región a través de una membrana celular o nuclear. Por ejemplo, véase una amplia variedad de conectores conocidos en la técnica en Chen et al. "Fusion protein linkers: property, design and functionality." Advanced Drug Delivery Reviews. http://dx.doi.org/10.1016/J.addr.2012.09.039. En realizaciones alternativas, el término "proteína de fusión" se utiliza para referirse a una subcategoría particular de producto conjugado que existe cuando no se utilizan tales conectores para formar el producto conjugado y los dominios están unidos completamente por enlaces peptídicos.

La primera región (HOX u otro homeodominio humano) y la segunda región (carga) pueden estar conectadas por una región conectora escindible, esta puede ser cualquier región adecuada para este propósito, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida por su adición. La región del conector escindible es un conector escindible por proteasa, aunque se pueden utilizar otros conectores, escindibles, por ejemplo, por moléculas pequeñas. Estos incluyen sitios Met-X, escindibles por bromuro de cianógeno, Asn-Gly, escindibles por hidroxilamina, Asp-Pro, escindibles por ácido débil y Trp-X escindibles por, entre otros, NBS-escatol. Los sitios de escisión por proteasa requieren condiciones de escisión más suaves y se encuentran, por ejemplo, en el factor Xa, la trombina y la colagenasa. Cualquiera de estos puede ser utilizado. Las secuencias precisas están disponibles en la técnica y el experto en la técnica no tendrá dificultades para seleccionar un sitio de escisión adecuado. A modo de ejemplo, la región de escisión por proteasa elegida como diana por el Factor Xa es I E G R (SEQ ID NO: 83). La región de escisión por proteasa elegida como diana por la Enteroquinasa es D D D D K (SEQ ID NO: 84). La región de escisión por proteasa elegida como diana por la trombina es L V P R G (SEQ ID NO: 85). La región conectora escindible puede ser una elegida como diana por las proteasas endocelulares. Los conectores pueden no ser necesarios para la función, pero se pueden incluir conectores entre la primera y la segunda regiones para permitir la liberación elegida como diana de la segunda región sin comprometer la función o para mejorar la actividad biológica de la segunda región con la escisión del conector.

Tabla 2: - muestra una lista parcial de conectores conocidos en la técnica, adaptados de Chen et al., 2012.

$(GGGGS)_n$, donde n = 1, 2, 3, o 4 (SEQ ID NO: 86)
$(Gly)_n$, donde n = 6 o 8 (SEQ ID NO: 87)
$(EAAAK)_n$ donde n = 1 - 3 (SEQ ID NO: 88)
$A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4$ A (SEQ ID NO: 89)
PAPAP (SEQ ID NO: 90)
AEAAAKEAAAKA (SEQ ID NO: 91)
$(Ala\text{-}Pro)_n$ donde n = 10 - 34 aa (SEQ ID NO: 92)
VSQTSKLTR↓AETVFPDV (SEQ ID NO: 93)
PLG↓LWAC (SEQ ID NO: 94)
RVL↓AEA (SEQ ID NO: 95); EDVVCC↓SMSY (SEQ ID NO: 96); GGIEGR↓GS (SEQ ID NO: 97); TRHRQPR↓GWE (SEQ ID NO: 98); AGNRVRR↓SVG (SEQ ID NO: 99); RRRRRRR↓R↓R (SEQ ID NO: 100)
GFLG↓ (SEQ ID NO: 101)
$A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ (SEQ ID NO: 89)
↓ = escindible en esta ubicación

Las realizaciones descritas permiten una acción terapéutica potente, que incluye la translocación eficaz en sitios de acción intracelulares e intranucleares de cualquiera de una serie de péptidos identificados para los tratamientos terapéuticos especificados, en los que (i) el SNC es un tejido diana; y (ii) independientemente del tejido diana, tal translocación no provoca una respuesta inmunitaria no deseada que pueda reducir la exposición y/o eficacia del producto conjugado o producir un evento clínico adverso o no deseable. El péptido biológicamente activo de la "segunda región" no está asociado de forma natural con la secuencia del homeodominio humano o variante o porción de la misma (la "primera región") antes de que se unan.

Adicionalmente, en una variedad de realizaciones, el producto conjugado o proteína de fusión pueden comprender una tercera región que también comprende un péptido de carga. Las FIG. 3a y 3b muestran realizaciones

alternativas que comprenden el homeodominio humano de 60 aminoácidos ("primera región", que se muestra abreviada aquí) y una proteína de carga adicional que puede dirigir la proteína de fusión o producto conjugado a su sitio de acción celular. En la FIG. 3a, el homeodominio HOX D12 humano (SEQ ID NO: 2) a la izquierda (**1**), está conectado en su extremo C terminal (**4**) al extremo N terminal (**5**) de un péptido de carga biológicamente activo de interés ("segunda región") (**2**), mientras que un tercer péptido de carga de interés ("tercera región") (**7**) está conectado en su extremo N terminal (**8**) al extremo C terminal (**6**) de la "segunda región" (**2**). Esta tercera región puede permanecer unida o fusionada mediante enlaces peptídicos a la proteína de fusión completa o puede estar diseñada para su eliminación después de la absorción o la unión a sitios específicos en tejidos elegidos como diana.

La FIG. 3b muestra una realización alternativa, con el homeodominio HOX D12 humano (SEQ ID NO: 2) a la derecha (**1**), conectado a través de su extremo N terminal (**3**) al extremo C terminas (**6**) de la segunda región (**2**), mientras que un péptido de carga de la tercera región (**7**) está conectado a través del extremo N terminal (**5**) de la segunda región (**2**). Las conexiones pueden ser enlaces peptídicos simples (**13**) o secuencias conectoras conocidas en la técnica (**12**), o una combinación de ambos, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida por la adición de una secuencia conectora. Un *segundo* péptido de carga ("tercera región") (**7**) puede dirigir el producto conjugado o la proteína de fusión a su sitio celular de acción. *Véase* el Ejemplo 2.

Las realizaciones de péptido conjugado y proteína de fusión en la presente memoria se pueden producir de acuerdo con cualquiera de las técnicas convencionales de la biología molecular descritas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methdos from Current Protocols in Molecular Biology, 5ª ed. John Wiley & Sons. Los métodos de fabricación, incluidos los métodos de purificación que se pueden utilizar, también se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.968.512.

Los "vectores de expresión" o "plásmidos" (utilizados indistintamente en la presente memoria) se pueden utilizar para producir productos conjugados o componentes de los mismos para introducir ADN heterólogo en células huésped, ya sea para expresión o replicación. La selección por el experto del vector apropiado dependerá de su uso previsto, es decir (amplificación de ADN o expresión de ADN), del tamaño del ADN que se vaya a insertar en el vector y de la célula anfitriona que se vaya a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su uso previsto, que comprenden uno o más de: un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción y una secuencia señal.

Las fuentes de ácido nucleico se pueden determinar mediante la referencia a la bibliografía publicada o bancos de datos proporcionados por organizaciones tales como NCBI o EMBL. La identificación de secuencias de interés se puede lograr utilizando BLAST, BLAT u otros algoritmos de búsqueda de homología. Adicionalmente, el ácido nucleico que codifica la primera o segunda región deseada se puede obtener de fuentes académicas o comerciales donde tales fuentes están dispuestas para proporcionar el material o sintetizando o clonando la secuencia apropiada donde solo están disponibles los datos de la secuencia. Generalmente, esto se puede realizar por referencia a fuentes de la bibliografía que describen la clonación del gen en cuestión. Alternativamente, cuando se dispone de datos de secuencia limitados o cuando se desea expresar un ácido nucleico homólogo o relacionado de otro modo con un ácido nucleico conocido, los ácidos nucleicos ilustrativos se pueden caracterizar como aquellas secuencias de nucleótidos que hibridan con las secuencias de ácido nucleico conocidas en la técnica.

La frase "rigurosidad de la hibridación" se refiere a las condiciones bajo las cuales los híbridos de poli(ácidos nucleicos) son estables. Tales condiciones son evidentes para los expertos en la técnica. También, como entienden los expertos en la técnica, la estabilidad de los híbridos se refleja en la temperatura de fusión (T_f) del híbrido que disminuye aproximadamente de 1 a 1,5°C con cada 1% de disminución en la homología de secuencia. En general, la estabilidad de un híbrido es función de la concentración de iones sodio y de la temperatura. La reacción de hibridación se realiza típicamente en condiciones de mayor rigurosidad, seguida de lavados de rigurosidad variable.

Como se emplea en la presente memoria, la frase "alta rigurosidad" se refiere a condiciones que permiten la hibridación de solo aquellas secuencias de ácido nucleico que forman híbridos estables en Na+ 1 M a 65-68°C. Se pueden proporcionar condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, mediante hibridación en una solución acuosa que contiene 6* SSC, 5* solución de Denhardt, SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1%, pirofosfato de Na+ 0,1 y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado como competidor inespecífico. Después de la hibridación, se puede realizar un lavado de alta rigurosidad en varias etapas, con un lavado final (aproximadamente 30 minutos) a la temperatura de hibridación en 0,2-0,1*SSC, SDS al 0,1%.

La frase "rigurosidad moderada" se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la solución descrita anteriormente, excepto que la temperatura es de aproximadamente 60-62°C. En ese caso, el lavado final se realiza a la temperatura de hibridación en 1*SSC, SDS al 0,1%.

La baja rigurosidad se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la solución descrita anteriormente a aproximadamente 50-52ºC. En ese caso, el lavado final se realiza a la temperatura de hibridación en 2*SSC, SDS al 0,1%.

Se entiende que estas condiciones se pueden adaptar y duplicar utilizando una variedad de tampones, p. ej., tampones basados en formamida, y temperaturas. La solución de Denhardt y el SSC son bien conocidos por los expertos en la técnica al igual que otros tampones de hibridación adecuados (véase, p. ej. Sambrook, et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York o Ausubel, et al., Eds. (1990) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.). Las condiciones óptimas de hibridación se deben determinar empíricamente, ya que la longitud y el contenido de GC de la sonda también juegan un papel.

En una realización, el producto conjugado o la proteína de fusión se pueden producir mediante el uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico y un promotor para la síntesis recombinante, por ejemplo, en células vegetales (incluidas las algas), en bacterias tales como *E. coli,* o en células eucarióticas tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de levadura.

En otra realización, una célula anfitriona se transforma con el vector de expresión.

En otra realización más, una secuencia de ácido nucleico codifica el producto conjugado o la proteína de fusión con fines de síntesis y fabricación mediante tecnología recombinante.

En algunas realizaciones, el producto conjugado o la proteína de fusión no están desnaturalizados, lo que significa que pueden existir en su estado nativo, la forma en que la proteína se produce en la célula intacta en su estructura tridimensional.

El término "no desnaturalizado" también puede, pero no necesariamente, implicar una etapa específica no desnaturalizante. La desnaturalización altera la forma tridimensional de la molécula de proteína sin ruptura de sus enlaces peptídicos; los enlaces disulfuro se pueden romper, o ciertos grupos en la proteína se pueden modificar químicamente si tales procesos también están acompañados por cambios en su estructura tridimensional general.

En otras realizaciones, el producto conjugado o la proteína de fusión se renaturalizan, un proceso mediante el cual la proteína desnaturalizada se devuelve a su conformación original antes de la desnaturalización. Para los péptidos, la desnaturalización reversible generalmente se produce por medio de agentes reductores de disulfuro y urea, y para el ácido nucleico, por medio de calor y sales.

En una realización, la primera región está en el extremo N-terminal de la segunda región. En otra realización, la primera región está en el extremo C terminal de la segunda región.

Los métodos de purificación conocidos en la técnica se pueden utilizar en el proceso de preparación de productos conjugados y proteínas de fusión de acuerdo con las realizaciones descritas, por ejemplo, como describe Zachariou, M. (2010) Affinity Chromatography: Methods and Protocols, 2ª ed. Totoua, NJ: Humana Press. El producto conjugado o la proteína de fusión se pueden obtener a partir de productos lisados de células bacterianas o eucarióticas, ya que los reactivos desnaturalizantes, los pequeños cambios en el pH y las diferencias en la osmolaridad pueden tener un efecto sobre las propiedades de translocación de los péptidos. Las condiciones para obtener y purificar los péptidos de homeodominio humano, incluidos los péptidos derivados de HOX, se describen en la presente memoria.

La capacidad de los productos conjugados de péptidos HOX para translocarse a través de la membrana de la superficie celular puede depender de la conformación de las proteínas recombinantes. Por ejemplo, la translocación del polipéptido mediante el uso de extractos de células bacterianas o proteínas purificadas expuestas a pequeñas cantidades de detergente (iónico y no iónico) o agentes desnaturalizantes (urea o guanidinio) puede prevenir o inhibir la translocación. Esta propiedad dependiente de la conformación se puede conservar purificando el producto conjugado de péptido HOX u otro producto conjugado de homeodominio humano en condiciones nativas.

En una realización, tanto la primera (el homeodominio humano o variante o porción del mismo) como la segunda (el péptido o proteína biológicamente activos) regiones se purifican a partir de un producto lisado bacteriano. En otras realizaciones, el producto conjugado o la proteína de fusión se purifican a partir de un producto lisado de células vegetales. En otra realización más, el producto conjugado o la proteína de fusión se purifican a partir de un producto lisado de células eucarióticas, medio de cultivo o caldo de fermentación.

Una realización es un método para preparar un producto conjugado o proteína de fusión, que comprende:

(a) cultivar la célula anfitriona en condiciones que proporcionan la expresión del producto conjugado a partir del vector de expresión dentro de la célula anfitriona; y

(b) recuperar el producto conjugado, cuya recuperación comprende

(i) fusionar una cola de aminoácidos u otro ligando específico al producto conjugado, cuya cola es capaz de unirse a al menos un sustrato y no a otro sustrato, y en donde el producto conjugado o la proteína de fusión se unen a través de la cola a al menos un sustrato, y en donde los componentes de la célula anfitriona no se unen a este sustrato, y

(ii) poner en contacto el producto conjugado y los componentes restantes de la célula anfitriona con el otro sustrato de manera que el producto conjugado no esté unido y los componentes restantes de la célula anfitriona estén unidos al otro sustrato.

Otra realización es un método para preparar un producto conjugado o proteína de fusión que comprende:

(i) cultivar una célula anfitriona, transformada con un vector de expresión que comprende ácido nucleico, conectado operablemente a un promotor, que codifica una proteína de fusión donde

(a) una primera región comprende el péptido HOX u otro péptido de homeodominio humano; y

(b) una segunda región no asociada naturalmente con la primera región comprende un péptido o proteína, en condiciones que proporcionan la expresión de la proteína de fusión del vector de expresión dentro de la célula anfitriona; y

(ii) recuperar la proteína de fusión, cuyo método comprende fusionar una cola de aminoácidos u otro ligando al producto conjugado, cuya cola es capaz de unirse a al menos un sustrato y no a otro sustrato, y en donde se hace que el producto conjugado se una a través de la cola a al menos un sustrato de manera que los componentes de la célula anfitriona no se unan a este sustrato; y el producto conjugado se pone en contacto con el otro sustrato de manera que el producto conjugado no está unido y los componentes restantes de la célula anfitriona están unidos al otro sustrato.

En otra realización, como parte del procedimiento de purificación por afinidad, las realizaciones incluyen el uso de una cola o ligando que están anclados al producto conjugado o a la proteína de fusión; esto permite etapas de purificación tanto positivas como negativas.

Para todas las secuencias de la primera y segunda región combinadas, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales a los extremos amino o carboxi para facilitar la purificación. Tales secuencias pueden incluir etiquetas FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 102), etiquetas myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 103), etiquetas His (tales como HHHHHH (SEQ ID NO: 80), HHHHHHGS (SEQ ID NO: 104), esta última utilizando un conector GS, véanse las FIG. 4 y 5), y otras etiquetas similares conocidas por los expertos en la técnica. Además, se pueden utilizar ligandos tales como la proteína aceptora de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 105) junto con la proteína BirA activa. Para secuencias que incluyen una metionina iniciadora de N-terminal, si se añade un dominio de purificación N-terminal, la metionina estará en el extremo N terminal del dominio de purificación en lugar de en el extremo N terminal de la primera región del péptido de homeodominio humano. Para cualquier etiqueta, se puede utilizar y eliminar un conector peptídico conocido en la técnica después de la purificación con una proteasa específica.

En una realización, la cola de aminoácidos o ligando se fusionan con el extremo C del producto conjugado. Por ejemplo, la FIG. 4 muestra una realización que comprende un péptido de carga biológicamente activo (2), conectado en su extremo C terminal (6) a través de un enlace peptídico (13) o una secuencia conectora conocida en la técnica (12) al extremo N terminal (3) de la "primera región" del homeodominio humano que se muestra abreviado aquí (1). Se muestra un conector GS (14) que ancla una etiqueta His ("cola") al extremo C terminal (6) del péptido de carga (2). Se puede utilizar cualquier conector siempre que no comprometa la función del producto conjugado.

En una realización, el sustrato inmovilizado es una columna de níquel o cobalto, una columna de avidina o una columna de anticuerpo con afinidad por la cola de aminoácidos. En otra realización, la cola de aminoácidos del producto conjugado se pone en contacto en serie con al menos dos sustratos inmovilizados con los que la cola tiene afinidad, en cuyo caso la columna de níquel o cobalto y/o avidina y/o anticuerpo se pueden utilizar en cualquier orden.

Un método para purificar un producto conjugado puede comprender fusionar una cola de aminoácidos o ligando con el producto conjugado o la proteína de fusión, cuya cola es capaz de unirse a al menos un sustrato mientras que las impurezas se unen solamente a un segundo sustrato; el producto conjugado se pone en contacto con el otro sustrato de manera que el producto conjugado no está unido y las impurezas restantes están unidas al otro sustrato.

Un método para producir y purificar un producto conjugado o proteína de fusión que comprenden el homeodominio humano de 60 aminoácidos o una variante o porción del mismo y un péptido o proteína biológicamente activos puede comprender cultivar la célula anfitriona para la expresión del producto conjugado o proteína de fusión a partir del vector de expresión vector y posteriormente recuperar el producto conjugado o la proteína de fusión utilizando mecanismos de purificación por afinidad conocidos en la técnica.

Cuando la segunda región es un dominio de unión a ADN, se puede formar un complejo con ácido nucleico mezclando el producto conjugado formado con el ácido nucleico.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los productos conjugados o proteínas de fusión de las realizaciones descritas en la presente memoria, y éstas se pueden utilizar para el tratamiento de una enfermedad.

En una realización, un producto conjugado o proteína de fusión comprenden un péptido o proteína biológicamente activos que son una enzima funcional, conectada al homeodominio humano o variante o porción del mismo.

Otras realizaciones comprenden cualquiera de una variedad de formulaciones para el tratamiento de afecciones o enfermedades identificadas.

Producción aguas arriba de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22. Se generó una construcción de expresión bacteriana para dos proteínas candidatas de homeodominio PPL-002 (SEQ ID NO: 21, Tabla 3) y PPL-003 (SEQ ID NO: 22, Tabla 3) susceptibles de expresión regulada de la proteína diana con una etiqueta His N-terminal escindible por TEV en el sistema vector T7. El sistema de expresión T7 es adecuado para producir material para estudios de eficacia en animales; sin embargo, también se contemplan otros vectores/sistemas de expresión y son conocidos por un experto en la técnica de biología molecular/biotecnología.

Las secuencias génicas con codones optimizados creadas sintéticamente se clonaron en el vector para la expresión inducible de la proteína seleccionada con selección de kanamicina. El ADN y las secuencias de aminoácidos correspondientes para las proteínas del homeodominio PPL-002 (p. ej., el plásmido pJ411: 129925) y PPL-003 (p. ej., pJ411: 129926) se muestran en la FIG. 6 y la FIG. 7, respectivamente. Cada proteína expresada contiene un líder de 6 HIS (SEQ ID NO: 80), con una secuencia de transición de SAA, seguida del sitio de escisión de TEV (ENLYFQS) (SEQ ID NO: 81) para producir la secuencia PPL-002 o PPL-003 con el extremo N terminal apropiado.

Tras la transformación en DH5α, se sometieron a prueba seis clones para cada construcción para detectar la presencia del inserto mediante digestión de restricción. La secuencia de ADN sintetizada fue secuenciada para su confirmación. Se utilizaron construcciones de expresión verificadas para cada proteína para transformar la cepa bacteriana E. coli BL21 (DE3), una cepa disponible comercialmente de Invitrogen (www.lifetechnologies.com/us/en/home/brands/invitrogen), y se preparó una provisión de partida de células en PD glicerol para cada clon que se expresaba mejor.

Se realizaron estudios preliminares de optimización de la expresión en cultivos en matraces oscilantes. Al pasar a fermentadores a pequeña escala, se realizó una optimización adicional del crecimiento celular. La complementación temprana con oxígeno y un punto de ajuste de pH de aproximadamente 7,1 mostraron ser óptimos. La temperatura de inducción se optimizó a aproximadamente 18°C.

Las realizaciones de composición descritas en la presente memoria pueden comprender un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables. El término "portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sustancia, no en sí misma un agente terapéutico, utilizada como portador o vehículo para el suministro de un agente terapéutico a un sujeto o añadida a una composición farmacéutica para mejorar sus propiedades de manipulación o almacenamiento o para permitir o facilitar la formación de una dosis unitaria de la composición, y que no produzca toxicidad inaceptable o interacción con otros componentes de la composición.

La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables se puede seleccionar en función de la formulación y la vía de administración prevista, así como de la práctica farmacéutica convencional. Tales composiciones pueden comprender cualquier agente que pueda ayudar, regular, liberar o aumentar la entrada en el compartimento del organismo, tejido, sitio diana intracelular o intranuclear, como aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante u otros agentes. También se puede utilizar un implante inyectable para la liberación sostenida de la proteína para obtener una exposición y acción prolongadas. El término "liberación sostenida" se refiere a formulaciones a partir de las cuales se libera el producto conjugado a una velocidad lenta que permite un período de exposición más prolongado a concentraciones activas.

Las composiciones que comprenden uno o más productos conjugados o proteínas de fusión descritos en la presente memoria se pueden administrar, dependiendo de la afección a tratar u otras consideraciones, de varias maneras, por ejemplo, sin limitación, por medio uno o más de los siguientes: (1) inhalación ; (2) en forma de supositorio o pesario;

(3) en forma de una loción tópica, solución, crema, pomada o polvo espolvoreable; (4) mediante el uso de un parche para la piel; (5) por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes; (6) inyectadas por vía parenteral, por ejemplo intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea; (7) para enfermedades oftálmicas, se pueden formular en forma de gotas para los ojos o para inyección intraocular; (8) para administración parenteral, pueden estar en forma de una solución acuosa estéril o implante inyectable que puede contener otras sustancias, por ejemplo, con un contenido adecuado de sal o monosacárido para hacer que la solución sea isotónica con la sangre o sustancias que permitan una liberación lenta; y (9) para administración bucal o sublingual, las composiciones se pueden administrar en forma de comprimidos o grageas que se pueden formular de manera convencional.

En una realización, el producto conjugado comprende:

una primera región que comprende una estructura de homeodominio humano y que tiene una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 1 o 2; y

una segunda región es un polipéptido o proteína funcionales o reguladores no asociada naturalmente con la primera región. En diversas realizaciones, la segunda región se selecciona del grupo que consiste en péptido NBD, p200 derivado de CTT de PC1, p21 derivado de CTT de PC1, glucocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronidato-2-sulfatasa, guanilil ciclasa de membrana retiniana, la construcción de péptido de dedo de cinc, ZF6xHunt-Kox-1, la construcción de péptido de dedo de cinc, ZF12xHunt-Kox-1, y la construcción de péptido de dedo de cinc, ZF18xHunt-Kox-1.

En la descripción, el producto conjugado puede comprender:

una primera región que comprende una estructura derivada de (1) los genes HOX humanos, o (2) otros genes humanos que tienen una secuencia descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 1 - 19, en donde 1 - 20, 1 - 15, o 1 - 10 residuos de aminoácidos están sustituidos, eliminados, añadidos y/o insertados y en donde dicho aminoácido tiene (i) actividad de homeodominio humano; y (ii) mantiene la actividad de permeabilización celular de las regiones helicoidales de los genes HOX humanos u otros genes humanos que contienen un homeodominio con propiedades de permeabilización celular; y

una segunda región es un polipéptido o proteína funcional o regulador no asociado naturalmente con la primera región. En diversas realizaciones, la segunda región se selecciona del grupo que consiste en péptido NBD, p200 derivado de CTT de PC1, p21 derivado de CTT de PC1, glucocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronidato-2-sulfatasa, guanilil ciclasa de membrana retiniana, la construcción de péptido de dedo de cinc, ZF6xHunt-Kox-1, la construcción de péptido de dedo de cinc, ZF12xHunt-Kox-1, y la construcción de péptido de dedo de cinc, ZF18xHunt-Kox-1.

La concentración activa de proteína de fusión o producto conjugado en cultivo celular puede ser menos de aproximadamente 115 µM, menos de aproximadamente 100 µM, menos de aproximadamente 90 µM, menos de aproximadamente 80 µM, menos de aproximadamente 70 µM, menos de aproximadamente 65 µM, menos de aproximadamente 60 µM, menos de aproximadamente 55 µM, menos de aproximadamente 50 µM, menos de aproximadamente 45 µM, menos de aproximadamente 40 µM, menos de aproximadamente 35 µM, menos de aproximadamente 30 µM, menos de aproximadamente 25 µM, menos de aproximadamente 20 µM, menos de aproximadamente 15 µM, menos de aproximadamente 10 µM, menos de aproximadamente 5 µM o menos de aproximadamente 1 µM por ejemplo, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 3 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 6 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 8 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 15 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 25 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 50 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 70 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 85 µM, menos de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 110 µM, menos de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 110 µM, menos de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 70 µM, menos de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 60 µM, menos de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 55 µM, o menos de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 45 µM.

O bien, la dosis administrada (diariamente o según sea necesario) en modelos de ratón (por ratón de 20 g) a través de (1) una inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.), (2) una formulación tópica o (3) una formulación inhalada puede ser de al menos 500 µg, al menos 450 µg, al menos 400 µg, al menos 350 µg, al menos 300 µg, al menos 250 µg, al menos 200 µg, al menos 150 µg, al menos 100 µg, al menos 80 µg, al menos 70 µg, al menos 60 µg, al menos 50 µg, al menos 40 µg, al menos 30 µg, al menos 20 µg, al menos 10 µg o al menos 1 µg, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 450 µg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 400 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 350 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 200 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 100 µg, de

aproximadamente 40 µg a aproximadamente 300 µg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 200 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 55 µg a aproximadamente 85 µg, de aproximadamente 60 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 60 µg a aproximadamente 100 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 200 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 70 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 µg, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µg.

Alternativamente, la dosificación suministrada (diariamente o según sea necesario) a través de una inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.) en un modelo de ratón puede ser de al menos 100 mg/kg, menos de aproximadamente 80 mg/kg, menos de aproximadamente 45 mg/kg, menos de aproximadamente 40 mg/kg, menos de aproximadamente 30 mg/kg, menos de aproximadamente 25 mg/kg, menos de aproximadamente 20 mg/kg, menos de aproximadamente 15 mg/kg, menos de aproximadamente 12 mg/kg, menos de aproximadamente 10 mg/kg, menos de aproximadamente 8 mg/kg, menos de aproximadamente 4 mg/kg, menos de aproximadamente 2 mg/kg o menos de aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo, de menos de aproximadamente 1 mg/kg kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, o de aproximadamente 12 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg.

La dosificación administrada (diariamente o según sea necesario) a través de una formulación inhalada en seres humanos (70 kg de peso) puede ser de al menos aproximadamente 600 mg, al menos aproximadamente 500 mg, al menos aproximadamente 450 mg, al menos aproximadamente 400 mg, al menos aproximadamente 350 mg, al menos aproximadamente 300 mg, al menos aproximadamente 250 mg, al menos aproximadamente 200 mg, al menos aproximadamente 150 mg, al menos aproximadamente 125 mg, al menos aproximadamente 100 mg, al menos aproximadamente 75 mg, al menos aproximadamente 50 mg, al menos aproximadamente 25 mg, al menos aproximadamente 20 mg, al menos aproximadamente 15 mg, al menos aproximadamente 10 mg, al menos aproximadamente 5 mg, al menos aproximadamente 1 mg, al menos aproximadamente 500 µg, al menos aproximadamente 450 µg, al menos aproximadamente 400 µg, al menos aproximadamente 350 µg, al menos aproximadamente 300 µg, al menos aproximadamente 250 µg, al menos aproximadamente 200 µg, al menos aproximadamente 150 µg, al menos aproximadamente 100 µg, al menos aproximadamente 80 µg, al menos aproximadamente 70 µg, al menos aproximadamente 60 µg, al menos aproximadamente 50 µg, al menos aproximadamente 40 µg, al menos aproximadamente 30 µg, al menos aproximadamente 20 µg, al menos aproximadamente 10 µg, o al menos aproximadamente 1 µg, por ejemplo, entre aproximadamente 1 µg a aproximadamente 750 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 450 µg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 400 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 350 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 200 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 40 µg aproximadamente 300 µg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 200 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 55 µg a aproximadamente 85 µg, de aproximadamente 60 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 60 µg a aproximadamente 100 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 200 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 70 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 15 mg; de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 110 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 10 mg a

aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 190 mg, de aproximadamente 130 mg a aproximadamente 180 mg, de aproximadamente 130 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 180 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 220 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 425 mg, de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 460 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 480 mg, de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 490 mg, de aproximadamente 380 mg a aproximadamente 550 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 580 mg, de aproximadamente 480 mg a aproximadamente 590 mg, o de aproximadamente 520 mg a aproximadamente 600 mg.

La dosificación suministrada (diariamente o según sea necesario) a través de la formulación tópica en seres humanos y en modelos de ratón puede ser menos de aproximadamente 5% p/vol, menos de aproximadamente 4,5% p/vol, menos de aproximadamente 3,5% p/vol, menos de aproximadamente 2,5% p/vol, menos de aproximadamente 1,5% p/vol, menos de aproximadamente 0,5% p/vol, menos de aproximadamente 0,4% p/vol, menos de aproximadamente 0,3% p/vol, menos de aproximadamente 0,2%, menos de aproximadamente 0,1% p/vol, menos de aproximadamente 0,09% p/vol, menos de aproximadamente 0,08% p/vol, menos de aproximadamente 0,07% p/vol, menos de aproximadamente 0,06% p/vol, menos de aproximadamente 0,05% p/vol, menos de aproximadamente 0,04% p/vol, menos de aproximadamente 0,03% p/vol, menos de aproximadamente 0,02% p/vol, menos de aproximadamente 0,01% p/vol, menos de aproximadamente 0,008% p/vol, menos de aproximadamente 0,006% p/vol, menos de aproximadamente 0,004% p/vol, o menos de aproximadamente 0,002% p/vol, por ejemplo entre aproximadamente 0,002% p/vol y aproximadamente 5% p/vol, aproximadamente 0,01% p/vol y aproximadamente 4% p/vol, aproximadamente 0,05% p/vol y aproximadamente 3% p/vol, aproximadamente 0,02% p/vol y aproximadamente 2,5% p/vol, aproximadamente 0,03% p/vol y aproximadamente 2 % p/vol, aproximadamente 0,05% p/vol y aproximadamente 1% p/vol, aproximadamente 0,06% p/vol y aproximadamente 0,9% p/vol, aproximadamente 0,07% p/vol y aproximadamente 0,6% p/vol, aproximadamente 0,08% p/vol y aproximadamente 0,4% p/vol, aproximadamente 0,09% p/vol y aproximadamente 0,2% p/vol o aproximadamente 0,09 p/vol y aproximadamente 0,1% p/vol.

La dosificación suministrada (diariamente o según se requiera) a través de una formulación tópica en seres humanos (70 kg de peso) puede ser menos de aproximadamente 70 µg, menos de aproximadamente 50 µg, menos de aproximadamente 45 µg, menos de aproximadamente 40 µg, menos de aproximadamente 30 µg, menos de aproximadamente 25 µg, menos de aproximadamente 20 µg, menos de aproximadamente 15 µg, menos de aproximadamente 12 µg, menos de aproximadamente 10 µg, menos de aproximadamente 8 µg, menos de aproximadamente 4 µg, menos de aproximadamente 2 µg, o menos de aproximadamente 1 µg, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 40 µg, de aproximadamente 8 µg a aproximadamente 30 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 20 µg, o de aproximadamente 12 µg a aproximadamente 15 µg, de aproximadamente 8 µg a aproximadamente 12 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 9, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 5 µg, o menos de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3 µg.

La dosificación sistémica suministrada (diariamente o según sea necesario) a través de una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular o un implante inyectable para formulaciones de liberación sostenida en seres humanos puede ser menos de aproximadamente 100 mg/kg, menos de aproximadamente 80 mg/kg, menos de aproximadamente 45 mg/kg, menos de aproximadamente 40 mg/kg, menos de aproximadamente 30 mg/kg, menos de aproximadamente 25 mg/kg, menos de aproximadamente 20 mg/kg, menos de aproximadamente 15 mg/kg, menos de aproximadamente 12 mg/kg kg, menos de aproximadamente 10 mg/kg, menos de aproximadamente 8 mg/kg, menos de aproximadamente 4 mg/kg, menos de aproximadamente 2 mg/kg, menos de aproximadamente 1 mg/kg, menos de aproximadamente 0,1 mg/kg, o menos de aproximadamente 0,01 mg/kg, por ejemplo, de menos de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de menos de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de menos de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de menos de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, o de menos de aproximadamente 12 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de menos de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg, de menos de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg, de menos de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de menos de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de menos de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de menos de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de menos de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg, de menos de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, o de menos de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2,00 mg/kg.

La dosificación suministrada (diariamente o según sea necesario) a seres humanos (basada en 70 kg de peso) a través de cualquier formulación que no sea una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular o un implante inyectable para la formulación de liberación sostenida, inhalada o tópica puede ser de al menos aproximadamente 600 mg, al menos aproximadamente 500 mg, al menos aproximadamente 450 mg, al menos aproximadamente 400

mg, al menos aproximadamente 350 mg, al menos aproximadamente 300 mg, al menos aproximadamente 250 mg, al menos aproximadamente 200 mg, al menos aproximadamente 150 mg, al menos aproximadamente 125 mg, al menos aproximadamente 100 mg, al menos aproximadamente 75 mg, al menos aproximadamente 50 mg, al menos aproximadamente 25 mg, al menos aproximadamente 20 mg, al menos aproximadamente 15 mg, al menos aproximadamente 10 mg, al menos aproximadamente 5 mg, al menos aproximadamente 1 mg, al menos aproximadamente 500 µg, al menos aproximadamente 450 µg, al menos aproximadamente 400 µg, al menos aproximadamente 350 µg, al menos aproximadamente 300 µg, al menos aproximadamente 250 µg, al menos aproximadamente 200 µg, al menos aproximadamente 150 µg, al menos aproximadamente 100 µg, al menos aproximadamente 80 µg, al menos aproximadamente 70 µg, al menos aproximadamente 60 µg, al menos aproximadamente 50 µg, al menos aproximadamente 40 µg, al menos aproximadamente 30 µg, al menos aproximadamente 20 µg, al menos aproximadamente 10 µg, o al menos aproximadamente 1 µg, por ejemplo, entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 750 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 450 µg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 400 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 350 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 200 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 40 µg aproximadamente 300 µg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 200 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 55 µg a aproximadamente 85 µg, de aproximadamente 60 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 60 µg a aproximadamente 100 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 200 µg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 70 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 15 mg; de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 110 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 190 mg, de aproximadamente 130 mg a aproximadamente 180 mg, de aproximadamente 130 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 180 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 220 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 425 mg, de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 460 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 480 mg, de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 490 mg, de aproximadamente 380 mg a aproximadamente 550 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 580 mg, de aproximadamente 480 mg a aproximadamente 590 mg, o de aproximadamente 520 mg a aproximadamente 600 mg.

La formulación se puede administrar sistémicamente o localmente (p. ej., inyección intraocular, formulación de enema, inhalación) a intervalos de 6 horas, 12 horas, diariamente o cada dos días o semanalmente o mensualmente para obtener el beneficio deseado o proporcionar un efecto terapéutico. O, la formulación se puede administrar según se requiera para obtener el beneficio deseado o proporcionar un efecto terapéutico.

La mejora en el gasto cardíaco post-infarto de miocardio (IM) se puede evaluar mediante ultrasonido. La mejora en la función neurológica posterior al accidente cerebrovascular se puede evaluar determinando el porcentaje de pacientes con un NIHSS de menos de 17 un mes después de la presentación. La inmunogenicidad del homeodominio humano o variante o porción del mismo de los productos conjugados o proteínas de fusión se puede evaluar determinando la incorporación de 3H-timidina por los linfocitos. La inmunogenicidad del homeodominio humano o variante o porción del mismo de los productos conjugados o proteínas de fusión se puede evaluar determinando el nivel de anticuerpos específicos producidos por el animal o ser humano receptor. La extensión de la lesión por isquemia-reperfusión se puede evaluar utilizando técnicas de histopatología conocidas para examinar el área de tejido necrótico en un modelo de accidente cerebrovascular. La acumulación de GAG se puede evaluar utilizando técnicas de histopatología conocidas.
Los déficits conductuales y motores en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington se pueden evaluar utilizando métodos publicados que evalúan la fuerza de agarre en las patas delanteras y la capacidad de equilibrio en un haz de equilibrio de un cilindro giratorio. Cada resultado será evaluado por métodos conocidos.

Tras el tratamiento de uno o más sujetos humanos o animales con cualquiera de las realizaciones de proteínas de

fusión o productos conjugados descritos, los sujetos pueden mostrar uno o más de los siguientes resultados:

(a) una reducción en la respiración entrecortada o la dificultad para respirar;

(b) una reducción en la producción de citocinas;

(c) una reducción de la concentración de TNF-α en sangre;

(d) una reducción de la concentración de IL-1 en sangre;

(e) una reducción de la concentración de IL-6 en sangre;

(f) una reducción en el número de células inflamatorias del fluido de lavado broncoalveolar (BALF);

(g) una reducción en los niveles de citocinas de BALF (p. ej., TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8);

(h) mejora de la función pulmonar (p. ej., FEV1);

(i) mejora en la capacidad funcional (incluido el ejercicio);

(j) una reducción en las exacerbaciones de la EPOC que requieren atención de urgencia u hospitalización;

(k) restauración de la secreción lagrimal hacia niveles normales;

(l) una reducción en la pérdida de cabello;

(m) un aumento en el crecimiento del cabello;

(n) una reducción en el área de tejido cerebral necrótico por MRI;

(o) una reducción en la proteína C reactiva (PCR);

(p) una reducción de la mortalidad aguda (es decir, al mes);

(q) una mejora en el gasto cardíaco post infarto de miocardio (IM) medida por ultrasonido;

(r) una mejora en la función neurológica posterior al accidente cerebrovascular medida por la determinación del porcentaje de pacientes con un NIHSS de menos de 17 un mes después de la presentación;

(s) una inhibición en el crecimiento renal;

(t) reducción de las respuestas alérgicas y reacciones a la infusión para los productos conjugados o proteínas de fusión con el homeodominio humano de 60 aminoácidos (o variante o porción del mismo) en comparación con tratamientos anteriores con la segunda región de carga sola;

(u) una reducción de los niveles de anticuerpos específicos anti-péptido de carga;

(v) una reducción en la acumulación de un sustrato de GCasa, glicosilceramida;

(w) una reducción en la excreción urinaria de dermatán sulfato;

(x) una reducción en la excreción urinaria de heparán sulfato;

(y) restauración de la función mediante electrorretinograma (ERG);

(z) restauración de la agudeza visual según lo determinado a través de la metodología clínica convencional;

(aa) normalización o mejora en los déficits motores, según lo evaluado utilizando la Puntuación Motora Total de la Escala Unificada de Valoración de la Enfermedad de Huntington (UHDRS); y/u otros métodos de puntuación clínicamente validados;

(bb) normalización del desarrollo esquelético según lo evaluado por las técnicas convencionales de crecimiento y desarrollo pediátrico;

(cc) normalización del desarrollo cerebral según lo evaluado por técnicas pediátricas convencionales;

(dd) una reducción de la progresión del tamaño y número de quistes renales evaluados por IRM;

(ee) un aumento en el nivel de interleucina-10 (IL-10) antiinflamatoria en sangre;

(ff) un aumento en el nivel de interleucina-10 (IL-10) antiinflamatoria en BALF;

(gg) una reducción en el nivel de IP-10 en sangre;

(hh) una reducción en el nivel de IP-10 en BALF; y/o

(ii) una reducción en la proteína A amiloide (SAA) en sangre;

(jj) una reducción en Kc de ratón o IL-8 humana en sangre o BALF;

(kk) una reducción en GM-CSF en sangre o BALF;

(ll) prevención de aumento en la turbidez vítrea graduada y/o células graduadas de la cámara anterior;

(mm) prevención del deterioro de la agudeza visual;

(nn) reducción del crecimiento de células tumorales y/o reducción del crecimiento tumoral;

(oo) reducción de la expresión de DYRK1b; y/o

(pp) reducción de la activación de genes regulados por NF-κB.

El paciente puede ser tratado durante un período, por ejemplo, de aproximadamente 1 día a lo largo de la vida del paciente, durante un período de aproximadamente 1 día a aproximadamente 200 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 100 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 80 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 50 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 40 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 20 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 15 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 12 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 semanas, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana, aproximadamente de 1 a 5 días, aproximadamente de 1 a 3 días, o aproximadamente de 1 a 2 días.

Alternativamente, una formulación de proteína de fusión o producto conjugado utilizada en cualquiera de los estudios propuestos en los ejemplos proporcionados, en otra investigación y tratamiento, incluyendo la investigación en animales para aplicaciones en seres humanos y animales, y el tratamiento veterinario, los miembros del grupo de tratamiento o los grupos de tratamiento puede mostrar uno o más de los siguientes resultados, cada uno en comparación con el momento inicial o el control, a menos que se indique lo contrario:

(a) una inhibición de la actividad transcripcional de NF-κB;

(b) una reducción en la producción de citocinas;

(c) una inhibición de la concentración de TNF-α en sangre;

(d) una inhibición de la concentración de IL-1 en sangre;

(e) una inhibición de la concentración de IL-6 en sangre;

(f) una reducción en el número de células inflamatorias del fluido de lavado broncoalveolar (BALF);

(g) una reducción en los niveles de citocinas del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) (p. ej., TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8);

(h) una reducción en la infiltración de células caliciformes en la córnea epitelial;

(i) una atenuación de la pérdida de células caliciformes en la conjuntiva;

(j) reducción de la angiogénesis linfática;

(k) restauración de la secreción lagrimal hacia niveles normales;

(l) una reducción en la pérdida de cabello o un aumento en el crecimiento del cabello;

(m) una reducción en el área del tejido cerebral necrótico como se evalúa con MRI;

(n) una reducción en la proteína C reactiva (PCR);

(o) una reducción de la mortalidad aguda (es decir, a un mes);

(p) una mejora en el gasto cardíaco post infarto de miocardio (IM) medido por ultrasonido;

(q) una mejora en la función neurológica posterior al accidente cerebrovascular medida por el porcentaje de pacientes con un NIHSS de menos de 17 un mes después de la presentación;

(r) una inhibición en el crecimiento renal;

(s) un cambio atenuado en la concentración de osteocalcina en la sangre, en comparación con el cambio provocado por el tratamiento con la proteína de fusión o producto conjugado con homeodominio-p200 humano, p. HOX C12-p200 o HOX D12-p200;

(t) reducción de las respuestas alérgicas y reacciones a la infusión para el producto conjugado de homeodominio humano de 60 aminoácidos (o variante o porción del mismo) o proteínas de fusión, según se evalúa mediante la incorporación de timidina 3H por linfocitos;

(u) una reducción en los niveles de anticuerpos específicos de péptido anti-carga;

(v) una reducción en la acumulación de un sustrato de GCasa, glicosilceramida;

(w) una reducción en la acumulación de productos añadidos de α-sinucleína/ubiquitina en el cerebro;

(x) una reducción en la excreción urinaria de dermatán sulfato;

(y) una reducción en la excreción urinaria de heparán sulfato;

(z) una reducción en el dermatán sulfato según lo determinado mediante histopatología;

(aa) una reducción en el heparán sulfato según lo determinado mediante histopatología;

(bb) restauración de la función mediante electrorretinograma (ERG);

(cc) restauración de la agudeza visual según lo determinado por la metodología clínica convencional;

(dd) una reducción o represión de la expresión del gen de Huntingtina mutante en el modelo murino de EH;

(ee) normalización o mejora de los déficits motores en pacientes, según se evalúa utilizando la Puntuación Motora Total de la Escala Unificada de Valoración de la Enfermedad de Huntington (UHDRS);

(ff) normalización o mejora en los déficits motores en ratones según se evalúa utilizando métodos publicados que evalúan la fuerza de agarre en las patas delanteras y la capacidad de equilibrio en un haz de equilibrio del cilindro giratorio;

(gg) una reducción en la pérdida neuronal y/o una reducción del volumen de células estriatales según lo evaluado por métodos moleculares y análisis histológicos en el modelo murino de EH;

(hh) un aumento en el nivel de interleucina-10 (IL-10) antiinflamatoria en sangre;

(ii) un aumento en el nivel de interleucina-10 (IL-10) antiinflamatoria en BALF;

(jj) una reducción en el nivel de IP-10 en sangre;

(kk) una reducción en el nivel de IP-10 en BALF;

(II) una reducción en la proteína A amiloide sérica (SAA) en sangre;

(mm) una reducción de IL-8 humana en sangre o BALF;

(nn) una reducción de GM-CSF en sangre o BALF;

(oo) prevención de un aumento de la turbidez vítrea graduada y/o células graduadas de la cámara anterior;

(pp) prevención del deterioro de la agudeza visual;

(qq) reducción del crecimiento de células tumorales y/o reducción del crecimiento tumoral;

(rr) reducción de la expresión de DYRK1b; y/o

(ss) reducción de la activación de genes regulados por NF-κB.

El tratamiento con una formulación que comprende una realización de una proteína de fusión y/o un producto conjugado descrita en estudios clínicos puede extenderse durante un período, por ejemplo, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 52 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 26 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 16 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 12 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 semanas, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana, aproximadamente de 1 a 6 días, aproximadamente de 1 a 4 días, o aproximadamente de 1 a 2 días.

Tras el tratamiento con una formulación que comprende una realización de una proteína de fusión y/o un producto conjugado descrita, el (1) paciente o los pacientes o (2) el grupo o los grupos de tratamiento como se describen en los estudios de los ejemplos, incluyendo animales experimentales tales como ratones en modelos animales, pueden mostrar uno o más de los siguientes resultados en comparación con los controles:

(a) una inhibición en la actividad transcripcional de NF-κB de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(b) una reducción en la producción y/o concentración de citocinas en sangre y/o BALF de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(c) una reducción de la concentración de TNF-α en sangre y/o BALF de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5 %, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de

aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(d) una reducción de la concentración de IL-1 en sangre y/o BALF de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5 %, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o de control);

(e) una reducción de la concentración de IL-6 en sangre y/o BALF de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5 %, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o de control);

(f) una reducción en el número de células inflamatorias del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o de control);

(g) una reducción en las citocinas del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) (p. ej., TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8) de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90% , al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, a al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(h) una reducción en la infiltración de células caliciformes en la córnea epitelial de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al

menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% cambio de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(i) una atenuación de la pérdida de células caliciformes en la conjuntiva de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60% , al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(j) reducción de la linfangiogénesis de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(k) restauración de la secreción lagrimal hacia niveles normales medidos por la prueba de Schirmer, con un aumento en la humectación de Schirmer de más de 20 mm, más de 15 mm, más de 10 mm, más de 5 mm, por ejemplo, entre 5 mm y 20 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 5 mm y 15 mm, entre 5 mm y 10 mm o entre 15 mm a 20 mm (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(l) una reducción en la pérdida de cabello o un aumento en el crecimiento del cabello de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(m) una reducción en el área del tejido cerebral necrótico de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, a al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de

aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(n) una reducción en la proteína C reactiva (PCR) sérica de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(o) una reducción de la mortalidad aguda (es decir, al mes) de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(p) una mejora en el gasto cardíaco post infarto de miocardio (IM), medida por ultrasonido, de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control)

(q) una mejora en la función neurológica posterior al accidente cerebrovascular medida por el porcentaje de pacientes con un NIHSS de menos de 17, un mes después de la presentación, de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(r) una inhibición en el crecimiento renal de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de

aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(s) un cambio atenuado en la concentración de osteocalcina utilizando HOX C12-p21, HOX D12-p21 u otra proteína de fusión o producto conjugado que contiene p21 en sangre que comprende un homeodominio humano con propiedades de permeabilización de la membrana celular de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el cambio provocado por el tratamiento, p. ej., la proteína de fusión o producto conjugado de HOX C12-p200 u otra proteína de fusión o producto conjugado que contiene p200 que comprende un homeodominio humano con propiedades de permeabilización de la membrana celular);

(t) una reducción de las respuestas alérgicas y las reacciones a la infusión de los productos conjugados o proteínas de fusión del homeodominio humano de 60 aminoácidos (o variante o porción del mismo) en comparación con sus proteínas de carga solas, según se evaluó mediante la incorporación de 3H-timidina por linfocitos de al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana con respecto al valor inicial o el control);

(u) una reducción en los niveles de anticuerpos específicos anti-péptido de carga después del tratamiento con productos conjugados o proteínas de fusión de homeodominio humano de 60 aminoácidos (o variante o porción del mismo) en comparación con el tratamiento con sus proteínas de carga solas, de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana con respecto al valor inicial o el control);

(v) reducción en la acumulación de un sustrato de GCasa, glicosilceramida de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de

aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(w) reducción en la acumulación de productos añadidos de α-sinucleína/ubiquitina en el cerebro de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% real de cambio o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(x) reducción en la excreción urinaria de dermatán sulfato de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(y) reducción en la excreción urinaria de heparán sulfato de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(z) reducción del dermatán sulfato como se determina mediante histopatología de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(aa) reducción del heparán sulfato según se determina mediante histopatología de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos

aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(bb) la restauración de la función mediante electrorretinograma (ERG) de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(cc) la restauración de la agudeza visual según lo determinado mediante la metodología clínica convencional de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(dd) una reducción o represión de la expresión del gen de Huntingtina mutante en el modelo murino de EH de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(ee) normalización o mejora en los déficits motores en pacientes, según se evalúa utilizando la Puntuación Motora Total de la Escala Unificada de Valoración de la Enfermedad de Huntington (UHDRS); en una cantidad absoluta de al menos aproximadamente 4 puntos, al menos aproximadamente 3 puntos, al menos aproximadamente 2 puntos, al menos aproximadamente 1,5 puntos, al menos aproximadamente 1 punto, al menos aproximadamente 0,5 puntos, al menos aproximadamente 0,4 puntos, al menos aproximadamente 0,3 puntos o al menos aproximadamente 0,2 puntos, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 puntos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 puntos, o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 puntos, y/o una mejora en la puntuación motora total de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de

aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% (en comparación con los grupos de control en el momento inicial y no tratados);

(ff) normalización o mejora en los déficits motores en ratones, según lo evaluado utilizando métodos publicados que evalúan la fuerza de agarre en las patas delanteras y la capacidad de equilibrio en un haz de equilibrio de cilindro giratorio de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% (en comparación con los grupos de control en el momento inicial y no tratados);

(gg) una reducción en la pérdida neuronal y/o una reducción en el volumen de células estriatales según lo evaluado por métodos moleculares y análisis histológicos en el modelo murino de EH de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10 % a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(hh) un aumento en IL-10 en plasma (sangre) y/o BALF de al menos aproximadamente 3.000%, al menos aproximadamente 2.000%, al menos aproximadamente 1.000%, al menos aproximadamente 500%, al menos aproximadamente 380%, al menos aproximadamente 360%, al menos aproximadamente 340%, al menos aproximadamente 320%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 280%, al menos aproximadamente 260%, al menos aproximadamente 240%, al menos aproximadamente 220%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 180%, al menos aproximadamente 160%, al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 120%, al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, a al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 400% a aproximadamente 500%, de aproximadamente 450% a aproximadamente 500%, de aproximadamente 420% a aproximadamente 480%, de aproximadamente 300% a aproximadamente 450%, de aproximadamente 350% a aproximadamente 430%, de aproximadamente 320% a aproximadamente 380%, de aproximadamente 200% a aproximadamente 350%, de aproximadamente 250% a aproximadamente 330%, de aproximadamente 220% a aproximadamente 280%, de aproximadamente 100% a aproximadamente 250%, de aproximadamente 150% a aproximadamente 230%, de aproximadamente 120% a aproximadamente 180%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 150%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 130%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 110%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de

aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(ii) un aumento en IL-10 en sangre o BALF hasta al menos aproximadamente 300 pg/mL, al menos aproximadamente 400 pg/mL, al menos aproximadamente 500 pg/mL, al menos aproximadamente 600 pg/mL, al menos aproximadamente 800 pg/mL, al menos aproximadamente 1.000 pg/mL, al menos aproximadamente 1.200 pg/mL, al menos aproximadamente 1.400 pg/mL, al menos aproximadamente 1.600 pg/mL, al menos aproximadamente 1.800 pg/mL, al menos aproximadamente 2.000 pg/mL, al menos aproximadamente 2.200 pg/mL, al menos aproximadamente 2.400 pg/mL, al menos aproximadamente 2.600 pg/mL, al menos aproximadamente 2.800 pg/mL, al menos aproximadamente 3.000 pg/mL, al menos aproximadamente 4.000 pg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 300 mg/ml a aproximadamente 3.900 pg/mL, de aproximadamente 380 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 400 pg/mL a aproximadamente 2.800 pg/mL, de aproximadamente 450 pg/mL a aproximadamente 2.500 pg/mL ml, de aproximadamente 500 pg/mL a aproximadamente 2.400 pg/mL, de aproximadamente 800 pg/mL a aproximadamente 3.000 pg/mL, de aproximadamente 900 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 1.200 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 1.400 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 1.800 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 2.000 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 2.200 pg/mL a aproximadamente 2.900 pg/mL, de aproximadamente 2.200 pg/mL a aproximadamente 3.000 pg/mL, pg/ml aproximadamente 2.500 pg/mL a aproximadamente 3.000 pg/mL, o pg/ml aproximadamente 2.500 pg/mL a aproximadamente 3.000 pg/mL.

(jj) una reducción en el nivel de IP-10 en sangre y BALF hasta al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control),

(kk) una reducción en la proteína A amiloide sérica (SAA) en sangre (plasma) de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, a al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(ll) una reducción en Kc en ratón o IL-8 humana en sangre y/o BALF de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(mm); una reducción en GM-CSF en sangre o BALF de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos

aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control);

(nn) prevención de un aumento clínicamente significativo en la turbidez vítrea graduada y/o las células graduadas de la cámara anterior, basado en criterios clínicos comúnmente aceptados conocidos por los expertos en la técnica.

(oo) prevención del deterioro de un cambio clínicamente significativo en la agudeza visual basado en criterios comúnmente utilizados y aceptados conocidos por los expertos en la técnica;

(pp) reducción del crecimiento de células tumorales y/o reducción del crecimiento tumoral de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, para ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control); y/o

(rr) reducción de la expresión de DYRK1b de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control); y/o

(ss) reducción de la activación de genes regulados por NF-κB de al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 5%, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% (% de cambio real o % de cambio de la mediana en comparación con el valor inicial o el control).

De acuerdo con las realizaciones descritas y sus modificaciones, los productos conjugados o proteínas de fusión se pueden utilizar solos o combinados con otros tratamientos o componentes de otros tratamientos. Las enfermedades y trastornos o afecciones que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de shock, reacciones de injerto contra anfitrión, enfermedad autoinmunitaria, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de

aspirina; crecimiento, invasión y diseminación tumoral, angiogénesis, metástasis, malignidad, ascitis y derrame pleural maligno; isquemia cerebral, cardiopatía isquémica, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; psoriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermólisis ampollosa; ulceración corneal, retinopatía y cicatrización de heridas quirúrgicas; rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anafilaxia; reestenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, aterosclerosis o endosclerosis, actividad de proliferación/diferenciación celular de citocinas y; actividad inmunosupresora o inmunoestimuladora (p. ej., para el tratamiento de la inmunodeficiencia, incluida la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de linfocitos; tratamiento del cáncer y muchas enfermedades autoinmunitarias, y para la prevención del rechazo del trasplante o la inducción de inmunidad tumoral); regulación de la hematopoyesis, p. ej. tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides; promoción del crecimiento de tejido óseo, cartílago, tendón, ligamento y nervio, p. ej. para curar heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración: inhibición o activación de la hormona estimuladora del folículo (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/quimiocinética (p. ej., para la movilización de tipos de células específicos a sitios de lesión o infección); actividad hemostática y trombolítica (p. ej., para el tratamiento de la hemofilia y el accidente cerebrovascular); actividad antiinflamatoria (para el tratamiento, p. ej., del choque séptico o enfermedad de Crohn); como antimicrobianos: moduladores p. ej. del metabolismo o comportamiento; como analgésicos; tratamiento de trastornos de deficiencia específicos; en el tratamiento p. ej. de la psoriasis, en medicina humana o veterinaria; actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de células T y, por lo tanto, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria, es decir, efectos inhibidores frente a una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, que incluye una respuesta no asociada con la inflamación; inhibición de la capacidad de los macrófagos y las células T para adherirse a los componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como la expresión del receptor fas regulada por aumento en las células T; inhibición de la reacción inmunitaria y la inflamación no deseadas, incluyendo la artritis, incluyendo la artritis reumatoide, inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades de colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada con aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de dificultad respiratoria u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis o otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, orquitis o epididimoorquitis, infertilidad, traumatismo orquidal u otras enfermedades testiculares relacionada con el sistema inmunológico, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas relacionada con la inflamación y/o el sistema inmunológico, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, p. ej. retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunitarios e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fundus, componentes inflamatorios del trauma ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, p. ej. después de una operación de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o inflamatoria contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas relacionadas con el sistema inmunológico e inflamatorio, inflamación asociada con enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunitarios donde, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, la supresión inmunitaria y/o inflamatoria resultaría beneficiosa, enfermedad de Parkinson, complicaciones y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionado con el SIDA-encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades degenerativas, afecciones o trastornos del SNC, componentes inflamatorios de Stokes, síndrome post-polio, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, encefalitis pan esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillaim-Barré, Corea de Sydenham, miastenia grave, pseudo-tumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de la compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofias y distrofias musculares, y enfermedades relacionadas con la inmunidad y la inflamación, afecciones o trastornos del sistema nervioso central y periférico, inflamación postraumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones y efectos secundarios inflamatorios y/o inmunitarios de la terapia génica, p.ej. debido a infección con un portador viral, o inflamación asociada con el SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para el tratamiento o la mejora de enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, p. ej. leucemia, al reducir la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o el tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células, tejidos y órganos naturales o artificiales, tal como córnea, médula ósea, órganos, cristalino, marcapasos, tejido de la piel naturales o artificiales.

Tabla 3: Identidades de secuencia de péptidos.

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
1	HOX C12	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLL
2	HOX D12	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVV
3	OTP	QKRHRTRFTPAQLNELERSFAKTHYPDIFMREELAL RIGLTESRVQVWFQNRRAKWKKRK
4	TLX1	KKKPRTSFTRLQICELEKRFHRQKYLASAERAALAK ALKMTDAQVKTWFQNRRTKWRRQT
5	TLX3	RKKPRTSFSRVQICELEKRFHRQKYLASAERAALAK SLKMTDAQVKTWFQNRRTKWRRQT
6	TLX2	RKKPRTSFSRSQVLELERRFLRQKYLASAERAALAK ALRMTDAQVKTWFQNRRTKWRRQT
7	NKX6-1	RKHTRPTFSGQQIFALEKTFEQTKYLAGPERARLAY SLGMTESQVKVWFQNRRTKWRKKH
8	NKX6-2	KKHSRPTFSGQQIFALEKTFEQTKYLAGPERARLAY SLGMTESQVKVWFQNRRTKWRKRH
9	NKX6-3	KKHTRPTFTGHQIFALEKTFEQTKYLAGPERARLAY SLGMTESQVKVWFQNRRTKWRKKS
10	NKX3-2	KKRSRAAFSHAQVFELERRFNHQRYLSGPERADLA ASLKLTETQVKIWFQNRRYKTKRRQ
11	BARHL1	PRKARTAFTDHQLAQLERSFERQKYLSVQDRMELA ASLNLTDTQVKTWYQNRRTKWKRQT
12	BARHL2	PRKARTAFSDHQLNQLERSFERQKYLSVQDRMDLA AALNLTDTQVKTWYQNRRTKWKRQT
13	BARX1	GRRSRTVFTELQLMGLEKRFEKQKYLSTPDRIDLAE SLGLSQLQVKTWYQNRRMKWKKIV
14	BARX2	PRRSRTIFTELQLMGLEKKFQKQKYLSTPDRLDLAQ SLGLTQLQVKTWYQNRRMKWKKMV
15	BSX	RRKARTVFSDSQLSGLEKRFEIQRYLSTPERVELAT ALSLSETQVKTWFQNRRMKHKKQL
16	DLX2	VRKPRTIYSSFQLAALQRRFQKTQYLALPERAELAA SLGLTQTQVKIWFQNRRSKFKKMW
17	DLX3	VRKPRTIYSSYQLAALQRRFQKAQYLALPERAELA AQLGLTQTQVKIWFQNRRSKFKKLY
18	DBX1	GMLRRAVFSDVQRKALEKMFQKQKYISKPDRKKL AAKLGLKDSQVKIWFQNRRMKWRNSK
19	DBX2	GILRRAVFSEDQRKALEKMFQKQKYISKTDRKKLAI NLGLKESQVKIWFQNRRMKWRNSK

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
20	**Dominio de unión NEMO ("NBD")**(solo péptido de la segunda región)	TALDWSWLQTE
21	**HOX C12-NBD** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 1 y 20 combinados)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLTALDWSWLQT E
22	**HOX D12-NBD** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 2 y 20 combinados)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVTALDWSWLQ TE
23	**péptido p200 derivado de la CTT de PC1** (solo péptido de la segunda región)	VILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRL RLWMGLSKVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVS PDVPPPSAGSDASHPSTSSSQLDGLSVSLGRLGTRCE PEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQLH SLQGRRSSRAPAGSSRGPSPGLRPALPSRLARASRG VDLATGPSRTPLRAKNKVHPSST
24	**HOX C12-p200** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 1 y 23 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLVILRWRYHA LRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGLSKV KEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGS DASHPSTSSSQLDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAV FEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQLHSLQGRRSSR APAGSSRGPSPGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSR TPLRAKNKVHPSST
25	**HOX D12-p200** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 2 y 3 combinados, que también muestra un residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVVILRWRYH ALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGLSK VKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAG SDASHPSTSSSQLDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQA VFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQLHSLQGRRSS RAPAGSSRGPSPGLRPALPSRLARASRGVDLATGPS RTPLRAKNKVHPSST
26	**péptido p21** (péptido alternativo de la segunda región para estructuras PKD)	IRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR
27	**HOX C12-p21** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 1 y 26 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLIRRIRLWMG LSKVKEFRHKVR
28	**HOX D12-p21** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 2 y 26 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVIRRIRLWM GLSKVKEFRHKVR

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
29	**VRQ397-**(antagonista no competitivo del receptor V2, que se puede conectar a estructuras de proteínas para dirigirse a p21 y p200 que contienen péptidos de fusión HOX o Homeodominio Humano)	CRAVKY
30	**secuencia de aminoácidos de glucocerebrosidasa ("GCasa")** (solo péptido de la segunda región)	ARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTF SRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQ KFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSY FSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLH NFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSP TWLKTNGAVNGKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKF LDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGF TPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRL LLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLAPA KATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSK FIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVV VLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRR Q
31	**HOX C12-GCasa** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 1 y 30 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLARPCIPKSFG YSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSG RRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGF GGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYN IIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKTNGA VNGKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHK LQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDFI ARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRLLLPHWAKV VLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLAPAKATLGETH RLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQ YSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRN FVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQR VGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVVVLNRSSKD VPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
32	**HOX D12-GCasa** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 2 y 30 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVARPCIPKSF GYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRS GRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKG FGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGY NIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEED TKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKTNG AVNGKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEH KLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRD FIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRLLLPHWAK VVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLAPAKATLGET HRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGM QYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVR NFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQ RVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVVVLNRSSK DVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ
33	**RetGC-1** (solo péptido de la segunda región)	AVFTVGVLGPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNR DPGLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVS GLVGPVNPAACRPAELLAEEAGIALVPWGCPWTQA EGTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQ DLWVEAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGA REALRKVRDGPRVTAVIMVMHSVLLGGEEQRYLL EAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAALA NSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDSLRRAQER RELPSDLNLQQVSPLFGTIYDAVFLLARGVAEARAA AGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPP FVLLDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHF PRGGSAPGPDPSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLL VVGMGLAGAFLAHYVRHRLLHMQMVSGPNKIILT VDDITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSG PSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATK TAFSKLQELRHENVALYLGLFLARGAEGPAALWEG NLAVVSEHCTRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLL DLIKGIRYLHHRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITD HGHGRLLEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPAL ERRGTLAGDVFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEE VVQRVRSPPPLCRPLVSMDQAPVECILLMKQCWAE QPELRPSMDHTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQ YSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVA EALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPI EVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVA SGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMP EVPVRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVN TASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELR GRTELKGKGAEDTFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPG SSNHGISLQEIPPERRRKLEKARPGQFS

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
34	**HOX C12-RetGC-1** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 1 y 33 combinados, que también muestra un residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLAVFTVGVLG PWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRDPGLAGGPR FEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPA ACRPAELLAEEAGIALVPWGCPWTQAEGTTAPAVT PAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRS LSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRD GPRVTAVIMVMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTD GSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAALANSSQLRRAHD AVLTLTRHCPSEGSVLDSLRRAQERRELPSDLNLQQ VSPLFGTIYDAVFLLARGVAEARAAAGGRWVSGA AVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDAAG DRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPD PSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGA FLAHYVRHRLLHMQMVSGPNKIILTVDDITFLHPHG GTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHLDSPNIG VYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELR HENVALYLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHC TRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGIRYLH HRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLEA QKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGD VFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQRVRSPP PLCRPLVSMDQAPVECILLMKQCWAEQPELRPSMD HTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLI RERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPV EPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDL YTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQRNGQ RHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIGL HSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTG LPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKGKG AEDTFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQEI PPERRRKLEKARPGQFS

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
35	**HOX D12-RetGC-1** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 2 y 33 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVAVFTVGVL GPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRDPGLAGGP RFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNP AACRPAELLAEEAGIALVPWGCPWTQAEGTTAPAV TPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGR SLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVR DGPRVTAVIMVMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLT DGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAALANSSQLRRAH DAVLTLTRHCPSEGSVLDSLRRAQERRELPSDLNLQ QVSPLFGTIYDAVFLLARGVAEARAAAGGRWVSG AAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDAA GDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGP DPSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAG AFLAHYVRHRLLHMQMVSGPNKIILTVDDITFLHPH GGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHLDSPNI GVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQEL RHENVALYLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEH CTRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGIRYL HHRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLE AQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAG DVFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQRVRSP PPLCRPLVSMDQAPVECILLMKQCWAEQPELRPSM DHTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDL IRERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTP VEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLND LYTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQRNG QRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIG LHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMEST GLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKGK GAEDTFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQ EIPPERRRKLEKARPGQFS
36	**ZF6xHunt-Kox-1** (solo péptido de la segunda región) que muestra 6 repeticiones de dedos de cinc	TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFA CDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRN FSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ RHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGG GSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEG MDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTA QQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKG EEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
37	**HOX C12-ZF6xHunt-Kox-1** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 1 y 36 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLTGAERPFQC RICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGS ERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSG GGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTA WSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNV MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVER EIHQETHPDSETAFEIKSSV
38	**HOX D12-ZF6xHunt-Kox-1** (Secuencia completa: SEQ ID NO: 2 y 36 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVTGAERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTG SERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSG GGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTA WSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNV MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVER EIHQETHPDSETAFEIKSSV
39	**ZF12xHunt-Kox-1** (solo péptido de la segunda región) que muestra 12 repeticiones de dedos de cinc	TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFA CDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRN FSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ RHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGG GSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRA TLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKI HTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPF ACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMR NFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATL QRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSP QHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVF VDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLG YQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETA FEIKSSV

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
40	**HOX C12-ZF12xHunt-Kox-1** (secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 39 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLTGAERPFQC RICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGS ERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSG GGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH TGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLR QKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGI IKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEW KLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVI LRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV
41	**HOX D12-ZF12xHunt-Kox-1** (secuencia completa, SEC ID NO: 2 y 39 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVTGAERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTG SERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSG GGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH TGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLR QKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGI IKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEW KLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVI LRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
42	**ZF18xHunt-Kox-1** (solo péptido de la segunda región) que muestra 18 repeticiones de dedos de cinc	TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFA CDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRN FSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ RHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGG GSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRA TLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKI HTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPF ACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMR NFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATL QRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAE RPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQR ATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTK IHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPF ACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGG GSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKS LTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYR NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLV EREIHQETHPDSETAFEIKSSV
43	**HOX C12-ZF18xHunt-Kox-1** (secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 42 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLTGAERPFQC RICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGS ERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSG GGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH TGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLR QKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRICM RNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRAT LQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRT HTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPF QCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGS QLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTAWSRT LVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLEN YKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQE THPDSETAFEIKSSV

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
44	**HOX D12-ZF12xHunt-Kox-1** (secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 42 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVTGAERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTG SERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSG GGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH TGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQ CRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQ RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLR QKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRICM RNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRAT LQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRT HTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPF QCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGS QLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTAWSRT LVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLEN YKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQE THPDSETAFEIKSSV
45	**Alfa-L-iduronidasa** (péptido de la segunda región de 653 aminoácidos de la segunda región que incluye la secuencia señal de 27 aminoácidos)	MRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVD AARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWD QQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGST GRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASG HFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVS KWNFETWNEPDHHDFDNVSMTMQGFLNYYDACS EGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCH DGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKV VAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWR ADVTYAAMVVKVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLS NDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLL RKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSNH TVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHP NRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDG EWRRLGRPVFPTAEQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPA GGRLTLRPALRLPSLLLVHVCARPEKPPGQVTRLRA LPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKA YTPVSRKPSTFNLFVFSPDTGAVSGSYRVRALDYW ARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
46	**HOX C12-Alfa-L-iduronidasa** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 45 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLMRPLRPRAA LLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARALWPLR RFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVG AVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNFTH LDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQ VFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNE PDHHDFDNVSMTMQGFLNYYDACSEGLRAASPAL RLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEA GVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPK FADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVV KVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLSNDNAFLSYHPHP FAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLA LLDEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQ GPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRG VPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPT AEQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRL PSLLLVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV WSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTF NLFVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVP YLEVPVPRGPPSPGNP
47	**HOX D12-Alfa-L-iduronidasa** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 45 combinados, que también muestra residuo de metionina iniciador	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVMRPLRPRA ALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARALWPL RRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYV GAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNFT HLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQ QVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWN EPDHHDFDNVSMTMQGFLNYYDACSEGLRAASPA LRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGE AGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFP KFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMV VKVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLSNDNAFLSYHP HPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGL LALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHR PQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLR GVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFP TAEQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALR LPSLLLVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV WSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTF NLFVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVP YLEVPVPRGPPSPGNP

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
48	**Iduronato-2-sulfatasa** (secuencia de 550 aminoácidos de la segunda región que incluye la secuencia señal de 25 aminoácidos)	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTD ALNVLLIIVDDLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHS LLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNS YWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGIS SNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGEL HANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMK TSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLA PDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPY GPIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDL QLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATH VPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEP GRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHV ELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQ YPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTV WVGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMY NDSQGGDLFQLLMP
49	**HOX C12-Iduronato-2-sulfatasa** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 48 combinados, que también muestra metionina iniciadora)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS DRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLMPPPRTGRG LLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVD DLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQ AVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNF STIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYS WSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVD VLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAV GYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLP PVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKI RQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFT SDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGR TASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLV ELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKN LLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQ WNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEF LANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSQGGDLF QLLMP

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
50	**HOX D12-Iduronato-2-sulfatasa** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 48 combinados, que también muestra metionina iniciadora)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL SNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVMPPPRTGR GLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIV DDLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQ QAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGN FSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPY SWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPV DVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLA VGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDG LPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQR KIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAF TSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPG RTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDL VELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGK NLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIP QWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPD EFLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSQGGD LFQLLMP
51	**Péptido uno de cuatro que abarca el epítopo 99-118** de **Ag85A** (secuencia 15 de aminoácidos de la segunda región, Vacuna TB)	ETFLTSELPGWLQAN
52	**Péptido Uno de cuatro de HOX C12-I Epítopo 99-118** de **Ag85A** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 51 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLETFLTSELPGW LQAN
53	**HOX D12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido uno de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 51 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVETFLTSELPG WLQAN
54	**Péptido dos de cuatro que abarca el epítopo 99-118 de Ag85A** (secuencia de 15 aminoácidos de la segunda región, Vacuna TB)	SELPGWLQANRHVKP
55	**HOX C12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido dos de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 54 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLSELPGWLQAN RHVKP

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
56	**HOX D12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido dos de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 54 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVSELPGWLQANRHVKP
57	**Péptido tres de cuatro que abarca el epítopo 99-118** de **Ag85A** (secuencia de 15 aminoácidos de la segunda región, vacuna TB)	WLQANRHVKPTGSAV
58	**HOX C12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido tres de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 57 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLWLQANRHVKPTGSAV
59	**HOX D12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido tres de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 57 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVWLQANRHVKPTGSAV
60	**Péptido cuatro de cuatro que abarca el epítopo 99-118 de Ag85A** (secuencia de 15 aminoácidos de la segunda región, Vacuna TB)	RHVKPTGSAVVGLSM
61	**HOX C12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido cuatro de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 60 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLRHVKPTGSAVVGLSM
62	**HOX D12-Epítopo 99-118 de Ag85A, péptido cuatro de cuatro** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 60 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVRHVKPTGSAVVGLSM
63	**Péptido uno de tres que abarca el epítopo 70-78** de **Ag85A** (secuencia de 15 aminoácidos de la segunda región, Vacuna TB)	QSGLSVVMPVGGQSS

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
64	**HOX C12-Epítopo 70-78 de Ag85A, péptido uno de tres** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 63 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLQSGLSVVMPV GGQSS
65	**HOX D12-Epítopo 70-78 de Ag85A, péptido uno de tres** (Secuencia completa, SEC ID NO: 2 y 63 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVQSGLSVVMPV GGQSS
66	**Péptido dos de tres que abarca el epítopo 70-78** de **Ag85A** (secuencia de 15 aminoácidos de la segunda región, vacuna TB)	VVMPVGGQSSFYSDW
67	**HOX C12-Epítopo 70-78 de Ag85A, péptido dos de tres** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 66 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLVVMPVGGQSS FYSDW
68	**HOX D12-Epítopo 70-78 de Ag85A, péptido dos de tres** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 66 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVVVMPVGGQSS FYSDW
69	**Péptido tres de tres que abarca el epítopo 70-78 de Ag85A** (secuencia de 15 aminoácidos de la segunda región, Vacuna TB)	GGQSSFYSDWYQPAC
70	**HOX C12-Epítopo 70-78 de Ag85A, péptido tres de tres** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 69 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLGGQSSFYSDW YQPAC
71	**HOX D12-Epítopo 70-78 de Ag85A, péptido tres de tres** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 69 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVGGQSSFYSDW YQPAC

ID de secuencia Núm.	Descriptor o gen del que deriva la secuencia	Secuencia
72	**Epítopo de Ag85A** (segunda región de carga)	AFSRPGLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSAVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVFDFP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
73	**HOX C12-Ag85A** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 1 y 72 combinados, Vacuna TB)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSD RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLL AFSRPGLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSAVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVFDFP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
74	**HOX D12-Ag85A** (Secuencia completa, SEQ ID NO: 2 y 72 combinados, Vacuna TB)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSN RLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVV AFSRPGLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSAVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVFDFP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA

A continuación, se describirán diversas características y realizaciones y modificaciones seleccionadas a modo de ejemplos no limitantes. En todos los ejemplos en los que se incluye una metionina iniciadora en una secuencia completa para permitir la síntesis recombinante, la metionina iniciadora se puede eliminar durante la purificación para derivar el producto activo con la secuencia de homeodominio humano indicada. Las referencias a los números de secuencia para productos conjugados completos en los párrafos que describen su uso se refieren al producto conjugado después de la eliminación de la metionina iniciadora.

Ejemplo 1

Los productos conjugados o péptidos o proteínas de fusión compuestos por el homeodominio humano de 60 aminoácidos y el péptido NBD de carga que inhibe la generación del factor de transcripción NF-κB son ejemplos de realizaciones que regulan la expresión génica a través de la interferencia en las interacciones proteína-proteína.

En una realización, la primera región de la secuencia de aminoácidos de HOX C12 es SEQ ID NO: 1:
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la primera región de la secuencia de aminoácidos HOX D12 es SEQ ID NO: 2:
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

En estas dos realizaciones, esta primera región está conectada a través de un enlace peptídico simple o, alternativamente, un conector conocido en la técnica, (Véase Tabla 2), al modificador esencial NF-κB (NEMO), abreviado NBD, para dominio de unión a NEMO, el péptido de "carga". Se puede utilizar cualquier conector siempre que su adición no comprometa la función del producto conjugado. La secuencia de aminoácidos de NBD es SEQ ID NO: 20, la segunda región:
TALDWSWLQTE
y la realización de la secuencia de la proteína de fusión completa que incorpora la primera región de HOX C12 (SEQ ID NO: 1), que contiene solo un enlace peptídico que conecta las dos regiones, es: SEQ ID NO: 21,
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLLTALDWSWLQTE

La realización de la secuencia de la proteína de fusión completa que incorpora la primera región de HOX D12 (SEQ ID NO: 2), que contiene solo un enlace peptídico que conecta las dos regiones, es:
SEQ ID NO: 22:
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVVTALDWSWLQTE

El tamaño de cada una de SEQ ID NO: 21 y 22 permite que toda la proteína de fusión se produzca sintéticamente. Si se producen a través de síntesis recombinante SEQ ID NO: 21 y 22, o las variantes o porciones de los mismos pueden incluir una metionina N-terminal. Los conectores no son necesarios para la función, pero se pueden incluir conectores en realizaciones alternativas entre la primera y la segunda regiones, siempre que no comprometan la función del producto conjugado. Con ese fin, se puede utilizar cualquier conector conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la Tabla 2) para producir realizaciones de este producto conjugado, y se alterarían los SEQ ID NO: 21 y 22, al menos en parte, en la medida en que la secuencia del conector uniera estas primera y segunda regiones.

En otras realizaciones adicionales, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales ("colas") a los extremos amino o carboxi terminales para facilitar la purificación. Tales secuencias pueden incluir etiquetas FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 102), etiquetas myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 103), etiquetas His (HHHHHH) (SEQ ID NO: 80) y otras etiquetas similares conocidas por los expertos en la técnica. Tales etiquetas pueden o no incluir conectores. Además, se pueden utilizar ligandos tales como la proteína aceptora de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 105) junto con la proteína BirA activa. Para secuencias que incluyen una metionina iniciadora N-terminal, si se añade un dominio de purificación N-terminal, la metionina estará en el extremo N-terminal del dominio de purificación en lugar de en el extremo N-terminal de la primera región del péptido del homeodominio humano. La FIG. 5 muestra una realización en la que el homeodominio HOX D12 se conjuga con el péptido de carga NBD, y se conjuga adicionalmente con una etiqueta His a través de un conector GS.

En diversas realizaciones, SEQ ID NO: 21 y 22 o una porción de los mismos se pueden formular para el suministro sistémico o local para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Las realizaciones del suministro local incluyen ejemplos tales como una formulación líquida o en polvo seco inhalada para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una formulación en enema colónico para la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn (enfermedad inflamatoria intestinal) con pomada colónica y/o rectal, una formulación de gota ocular para enfermedades oculares inflamatorias tales como ojos secos (queratoconjuntivitis seca), uveítis y escleritis y ungüentos y formulaciones en crema tópicos para enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias de la piel tales como psoriasis y alopecia areata. Las formulaciones sistémicas incluyen inyecciones intravenosas, subcutáneas e intramusculares y formulaciones de implantes inyectables para liberación sostenida para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, etc., y afecciones inflamatorias agudas tales como inestabilidad inflamatoria de la placa aterosclerótica para la prevención del infarto agudo de miocardio (trombosis de la arteria coronaria) y el accidente cerebrovascular, prevención de la lesión por isquemia-reperfusión en el accidente cerebrovascular y el infarto de miocardio (reducción del tamaño del infarto y mejora de la función) y en pacientes con trasplante de órganos (mejora de la función orgánica). En la medida en que la activación de las rutas inflamatorias de NF-κB están involucradas en la patogénesis y progresión de ciertos cánceres, como se informa ampliamente en la bibliografía, por ejemplo, en el cáncer de colon, pulmón y algunos cánceres de piel, la administración sistémica incluye el tratamiento del cáncer.

SEQ ID NO: 21 (marcado como PPL-002 en los estudios descritos) y SEQ ID NO: 22 (marcado como PPL-003 en los estudios descritos) se sintetizaron químicamente y sus respectivas propiedades físicas y biológicas se caracterizaron y se compararon con dos construcciones basadas en Antennapedia que pueden atravesar las membranas celulares con la misma carga del dominio de unión a NEMO (NBD) de 11 aminoácidos (SEQ ID NO: 20)

que se ha descrito previamente (M.J. May et al. "Selective inhibition of NF-κB activation by a peptide thas blocks the interaction of NEMO with the IkB kinase complex" Science 289:1550-54, 1 de septiembre, 2000; I Strickland y S Ghosh. "Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation" Ann. Rheum. Dis. 65(Supl 3):iii75-iii82, 2006). Uno de estos péptidos de fusión utiliza una secuencia de 17 aminoácidos N-terminal del homeodominio Antennapedia y el péptido NBD de 11 aminoácidos en su extremo C-terminal y se marcó como PPL-004 en estos estudios. La otra construcción basada en Antennapedia es un péptido de fusión que combina el homeodominio de 60 aminoácidos de Antennapedia con la misma carga de NBD de 11 aminoácidos y está marcada como PPL-001 en estos estudios.

Características físicas: SEQ ID NO: 22, (PPL-003), difería en su solubilidad e interacciones salinas en comparación con SEQ ID NO: 21 (PPL-002) que lo hacían más adecuado para el desarrollo farmacéutico. También difería en estas características en comparación con el péptido NBD basado en Antennapedia publicado (PPL-004) y el otro péptido NBD basado en Antennapedia, PPL-001.

Los péptidos PPL-001, PPL-002 y PPL-004 son solubles en agua; sin embargo, no demostraron solubilidad en tampones que contenían sal tales como los comúnmente utilizados como vehículos o formulaciones farmacéuticos. En solución salina tamponada con Tris 10 mM, pH 7,4, que es la administración farmacéutica utilizada convencionalmente, PPL-003 era soluble como una solución clara incluso a la concentración más alta sometida a prueba, 5 mg/mL (0,566 mM), mientras que PPL-002 (1 mg/mL) formaba una solución turbia posiblemente debido a interacciones de la sal con los grupos cargados en el péptido. Los péptidos NBD basados en Antennapedia (PPL-001 y PPL-004) también eran insolubles en esta solución salina tamponada. El uso de arginina 1 mM, Tween 20 al 0,01% y 0,1% o adición de histidina a una solución salina tamponada con Tris y el uso de soluciones tamponadas con citrato no mejoraron las características de solubilidad de PPL-001, PPL-002 o PPL-004. Las diferentes características de solubilidad de PPL-003 en comparación con PPL-002 y los péptidos basados en Antennapedia no se pronosticaron basándose en las diferencias estructurales. Además, solamente PPL-003 se pudo disolver por completo a 5 mg/mL en soluciones salinas fisiológicas tamponadas con fosfato a pH 7,4.

Los autores de la presente invención sometieron a prueba la capacidad de ciertas realizaciones de los péptidos permeabilizantes de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-NBD (proteínas de fusión) descritos para inhibir la activación de NF-κB y la formación de citocinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) cuando éste es preincubado con células antes de la estimulación con endotoxina utilizando mecanismos conocidos en la técnica. Los autores de la presente invención realizaron estudios *in vitro* que utilizan realizaciones que comprenden SEQ ID NO: 21 y/o NO: 22, o una porción de los mismos en los que se midieron las actividades transcripcionales de NF-KB estimulado por TNF-α y donde se estudió la producción de citocinas estimuladas por endotoxina.

Las realizaciones del péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (SEQ ID NO: 21 y/o 22 o variante o porción de los mismos) fueron activas en ambos ensayos *in vitro* a diversas concentraciones entre aproximadamente 50 μM y aproximadamente 200 μM, y la actividad transcripcional de NF-κB estimulado por TNF-α y/o la producción de citocinas se midieron por métodos conocidos y se compararon con el grupo de control.

Actividad *in vitro* utilizando líneas celulares informadoras de luciferasa NF-κB: Se utilizaron un ensayo *in vitro* que medía la inhibición de la activación de NF-κB utilizando una línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293) estimulada por TNF-α y una línea celular de tipo macrófago murino (RAW 264.7) estimulada por endotoxina (LPS), ambas con un gen informador de luciferasa NF-κB, para medir la bioactividad de las realizaciones de péptidos que pueden penetrar en las células con la carga NBD (Park et al. Phosphoinositide-dependent kinase 1 integrates T cell receptor and CD28 co-receptor signaling to effect NF-κB induction and T cell activation. Nat Immunol. 10(2):158-166, Febrero 2009). (FIG. 8a y 8b).

CLAVE para las FIG. 8a, 8b y 9:

No estimulado o vehículo	Células sin endotoxina (LPS) o estimulación por TNF-α
LPS	Células estimuladas con endotoxina (LPS) 10 ng/mL o TNF-α humano a 10 ng/mL durante 4 horas después de una incubación durante 3 horas con tampón de control
Mutante: 200 micromolar	Células estimuladas con endotoxina (LPS) 10 ng/mL o TNF-α humano a 10 ng/mL durante 4 horas después de una incubación durante 3 horas con el péptido inactivo mutante NBD
NBD	Células estimuladas con endotoxina (LPS) 10 ng/mL o TNF-α humano a 10 ng/mL durante 4 horas después de una incubación durante 30 horas con péptido adquirido comercialmente con una secuencia de homeodominio basada en Antennapedia de 17 aminoácidos y una secuencia de NBD de 11 aminoácidos C terminal (SEQ ID NO: 020 es la porción NBD)

PPL-001	Células estimuladas con endotoxina (LPS) 10 ng/mL o TNF-α humano a 10 ng/mL durante 4 horas después de una incubación durante 3 horas con un péptido producido por Portage Pharmaceuticals con una secuencia de homeodominio basada en Antennapedia de 60 aminoácidos y un secuencia de NBD de 11 aminoácidos C terminal (SEQ ID NO: 020).
PPL-002 (SEQ ID NO: 21)	Células estimuladas con endotoxina (LPS) 10 ng/mL o TNF-α humano a 10 ng/mL durante 4 horas después de una incubación durante 3 horas con un péptido producido por Portage Pharmaceuticals con una secuencia de homeodominio HOX-C12 humano de 60 aminoácidos (SEQ ID NO: 001) y una secuencia de NBD de 11 aminoácidos C terminal (SEQ ID NO: 020)
PPL-003 (SEQ ID NO: 22)	Células estimuladas con endotoxina (LPS) 10 ng/mL o TNF-α humano a 10 ng/mL durante 4 horas después de una incubación durante 3 horas con un péptido producido por Portage Pharmaceuticals con una secuencia de homeodominio HOX-D12 humano de 60 aminoácidos (SEQ ID 002) y una secuencia de NBD de 11 aminoácidos C terminal (SEQ ID 020).

En los experimentos iniciales, estos péptidos se disolvieron primero en DMSO y a continuación se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato antes de la adición al medio de cultivo de tejido completo que contenía las líneas celulares indicadoras de luciferasa NF-κB. En estos estudios, se encontró que PPL-003 tenía una actividad similar a PPL-004 y una versión comercialmente disponible de PPL-004 con la estructura idéntica. En una prueba, un péptido mutante de control con un cambio en la secuencia de NBD que lo hacía incapaz de unirse a la secuencia diana de NBD estaba inactivo, lo que demuestra la especificidad de la prueba para la secuencia de NBD utilizada como carga.

Cuando la concentración final de DMSO se ajustó a 1% para todos los péptidos y se midió su capacidad para inhibir la activación de NF-κB estimulado por TNF-α humano (5 ng/ml) utilizando células HEK 293, hubo una clara respuesta a la dosis para todos los péptidos. Sin embargo, PPL-003 parecía ser más potente que los demás a la misma, y más baja concentración de 50 micromolar. La FIG. 9 informa sobre la señal de luciferasa como un porcentaje de las células estimuladas con TNF-α sin pretratamiento de péptido.

En el modelo de sensibilización con endotoxina intravenosa sistémica para roedores, los ratones se pretrataron utilizando la administración intravenosa sistémica (i.v.) o intraperitoneal (i.p.) de formulaciones de la realización que comprenden el péptido de carga NBD conjugado con un homeodominio HOX C12 u HOX D12 humanos (SEQ ID NO: 21 y/o 22) como se describe a continuación y en futuros estudios a una dosis por 20 g de ratón de 1 µg a al menos 2.000 µg o más. Se midieron múltiples citocinas inflamatorias y antiinflamatorias y la proteína de fase aguda, amiloide A sérico (SAA) en sangre y los resultados se compararon con el grupo de control negativo con vehículo y con un grupo de control positivo pretratado con dexametasona.

Actividad *in vivo* de péptidos que pueden penetrar en las células que contienen carga NBD: Los estudios iniciales se realizaron en ratones pretratados por inyección i.p. de péptidos a una dosis de 500 microgramos (µg) por ratón (10 mg/kg) o dexametasona (3 mg/kg) 30 minutos antes de la sensibilización mediante inyección de endotoxina (LPS) a una dosis de 50 microgramos/kg. La capacidad del pretratamiento de péptido para inhibir la respuesta inflamatoria de citocinas o estimular la respuesta antiinflamatoria de citocinas a LPS se determinó 2 horas después de la inyección de LPS (FIG. 10).

Los niveles de citocinas en el plasma de ratones dos horas después de la inyección de LPS se redujeron en ratones tratados con péptidos que contenían NBD. (FIG 11a y 11b). Por ejemplo, los niveles de TNF-α e IP-10 (CXCL 10) se redujeron de manera convincente mediante el pretratamiento con PPL-003 con algunos ratones que demostraron niveles reducidos de estas citocinas similares a los del grupo tratado con dexametasona. Curiosamente, PPL-003 se diferenciaba de PPL-004 con respecto a sus capacidades para reducir la respuesta de IP-10. Mientras que los niveles de IP-10 se redujeron mediante pretratamiento i.p. con PPL-003 a niveles similares a los medidos después del tratamiento con dexametasona, no hubo efecto del pretratamiento i.p. con PPL-004 sobre los niveles plasmáticos de IP-10. Estos efectos selectivos en citocinas específicas pueden tener implicaciones importantes para PPL-003 como agente terapéutico para enfermedades inflamatorias.

El pretratamiento con las realizaciones de PPL-002 y PPL-003 también conduce a un aumento de los niveles de la citocina antiinflamatoria Interleucina-10 (IL-10). Los péptidos se dosificaron tanto i.p. como i.v. a 500 microgramos por ratón (10 mg/kg) 30 minutos antes de la sensibilización mediante inyección de endotoxina (LPS) a una dosis de 50 microgramos/kg. La Dexametasona dosificada i.p. a 3 mg/kg no tuvo efecto sobre los niveles de IL-10 mientras que el tratamiento i.p. con PPL-002 (SEQ ID NO: 21) condujo a un aumento significativo en IL-10 ($p < 0,01$). Los pretratamientos i.v. de la realización con PPL-002 (SEQ ID NO: 21) y PPL-003 (SEQ ID NO: 22) también aumentaron los niveles de IL-10. Curiosamente, esta capacidad para aumentar los niveles de IL-10 después de la sensibilización con LPS no se observó en ratones pretratados con PPL-004, el péptido NBD que puede penetrar en las células publicado con una secuencia de 17 aminoácidos N-terminal del homeodominio Antennapedia y el péptido NBD de 11 aminoácidos en su extremo C-terminal (Figura 12) donde no hubo diferencia detectable entre los grupos

pretratados con PPL-004 y con vehículo.

Actividad y farmacocinética de PPL-003 recombinante derivado de E. coli. Una realización recombinante de PPL-003 (SEQ ID NO: 22) producido en E. coli y purificado como se describe anteriormente (véase *Producción Aguas Arriba de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22)* se administró mediante inyección intraperitoneal en una solución salina fisiológica tamponada con Tris 10 mM, pH 7,4, a ratones, y la concentración plasmática de PPL-003 se midió mediante un ensayo ELISA que utilizó un anticuerpo de conejo purificado por afinidad para SEQ ID NO: 20, la carga de NBD. A los ratones se les inyectaron 500 µg [microgramos], 1.000 µg o 2.000 µg de PPL-003 y se tomaron muestras de sangre en los puntos de tiempo indicados (FIG. 13). Se evitó la coagulación de la sangre con EDTA y el plasma se separó por centrifugación. Los niveles de PPL-003 se midieron por ELISA y se calcularon utilizando una curva patrón de PPL-003 puro sintetizado químicamente. El PPL-003 en plasma fue medible a los 5 minutos de la administración de la dosis y la Cmáx fue aproximadamente a los 30 minutos con niveles que alcanzaron el límite inferior de detección a aproximadamente 240 minutos después de la dosificación (FIG. 13-14).

Como antes, los ratones se sensibilizaron con LPS después de la dosificación con PPL-003 recombinante y se midieron las respuestas de múltiples citocinas a la inyección de LPS 2 horas después de la sensibilización con LPS. La dosificación con PPL-003 fue al mismo tiempo que la sensibilización con LPS, 30 minutos antes de la sensibilización con LPS o 60 minutos antes de la sensibilización con LPS. A modo de comparación, se inyectó dexametasona 30 minutos antes de la sensibilización con LPS.

Los niveles plasmáticos estimulados por LPS de proteína A amiloide (SAA), TNFα, IP-10, GM-CSF, IL-6, KC (equivalente de IL-8 humana, CXCL1) y MCP-1 se redujeron a niveles inferiores a los alcanzados con pretratamiento con dexametasona, mientras que los niveles de citocina antiinflamatoria IL-10 se elevaron significativamente. En general, la mayor inhibición fue con la dosificación 30 minutos antes de la sensibilización con LPS, aunque la inhibición de SAA fue mayor con la inyección simultánea de PPL-003 y LPS (FIG. 15a, 15b, 16a y 16b). Las reducciones porcentuales promedio en la concentración de SAA se indican encima de las barras en la Figura 16a. Los aumentos de IL-10 y las disminuciones de Kc fueron mayores con la dosificación 60 minutos antes de la inyección de LPS. (FIG. 17a y 17b)

Las FIG. 18a y 18b muestran la inhibición de la respuesta de GM-CSF a la sensibilización i.v. de LPS (endotoxina) en ratones cuando se inyectó PPL-003 (i.p.). 60 y 30 minutos antes de que se administrara LPS, y al mismo tiempo de la administración de LPS (0 min.). La reducción de GM-CSF es mayor que la observada después del pretratamiento con dexametasona, que proporciona una inhibición modesta. PPL-003 es más potente que PPL-004 a la misma dosificación en microgramos, aunque la dosificación molar de PPL-004 fue aproximadamente tres veces mayor que la de PPL-003 a dosis equivalentes en microgramos.

El suministro local o el suministro tópico evitarán la actividad sistémica no deseada que podría dar como resultado la susceptibilidad a infecciones en el caso de la proteína de fusión que contiene el péptido NBD. En cuanto a una formulación inhalada para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se evaluará la capacidad de una o más de las realizaciones de producto conjugado o proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-NBD descritas (SEQ ID NO: 21 o 22, o una porción de los mismos) para inhibir la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias en un modelo bien descrito en roedores (ratones y ratas) después del pretratamiento por inhalación de estos compuestos antes de la inhalación de endotoxina. Específicamente, los autores de la presente invención realizarán un estudio utilizando una o más realizaciones de proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio humano-NBD a diversas concentraciones, por ejemplo entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 115 µM, y evaluarán la inhibición máxima correspondiente de las respuestas celulares y de citocinas estimuladas por endotoxina en BALF. Además, se planean estudios en seres humanos sensibilizados con pequeñas dosis de endotoxina inhalada para evaluar (i) realizaciones de formulación líquida suministradas por medio de un nebulizador; y (ii) realizaciones de formulación de polvo seco, comprendiendo cada una de tales formulaciones SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos. Estas realizaciones del sistema de formulación y suministro tendrán eficacia en pacientes con enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias tales como EPOC.

En la sensibilización con endotoxina inhalada por roedores, se administró a los ratones a través de una formulación inhalada, una realización que comprendía el péptido de carga NBD conjugado con un homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) a una dosis por ratón de al menos 1 µg a al menos aproximadamente 200 µg o más. Las concentraciones de TNF-α e IL-6 en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se medirán mediante métodos conocidos y los resultados se compararán con el grupo de control.

También en la sensibilización con endotoxina inhalada por roedores, se administró a los ratones a través de una formulación inhalada, otra realización que comprendía el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano variante o porción de los mismos (por ejemplo, SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) a una dosis por ratón de al menos 1 µg a al menos aproximadamente 200 µg o más. El número de

células inflamatorias del líquido de lavado broncoalveolar (BALF) se medirá mediante métodos conocidos y los resultados se compararán con el grupo de control.

En la sensibilización con endotoxina inhalada por humanos, se administrará una realización de formulación inhalada a voluntarios sanos que comprende el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio humano o una variante o porción del mismo (por ejemplo, SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos), a una dosis por persona de 70 kg de al menos 1 µg a al menos aproximadamente 600 mg o más. Las concentraciones de TNF-α, IL-6 e IL-1 y los números de células inflamatorias en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se medirán mediante métodos conocidos y los resultados se compararán con el grupo de control.

La sequedad ocular, queratoconjuntivitis seca, es una afección médica en la que la inflamación local conduce a una reducción de la producción de lágrimas. En su caso extremo, se produce daño corneal. Los síntomas de ojos secos, tales como ardor, dolor, exceso de reflejo de lagrimeo en el aire seco o condiciones de viento son muy comunes y los casos leves se tratan con "lágrimas artificiales". Sin embargo, es necesaria la terapia inmunosupresora tópica para casos moderados a severos, por ejemplo, gotas para los ojos de ciclosporina (Restasis®) elaboradas por Allergan. Recientemente se ha implicado la importancia de la señalización del receptor de tipo Toll (TLR), y se han desarrollado modelos murinos (Redfern et al. "Toll-Like Receptor Expression and Activation in Mice with Experimental Dry Eye" que apareció en Invest. Oftalmol Vis. Sci. 54(2):1554-63, 28 de febrero, 2013). Inicialmente, los autores de la presente invención realizarán un estudio en el modelo de ojo seco experimental (EDE) murino en el que se pueden evaluar los biomarcadores inflamatorios y los cambios patológicos. Por ejemplo, los autores de la presente invención evaluarán el efecto de una o más realizaciones de la proteína de fusión o el producto conjugado que contienen péptido NBD administrados en una formulación tópica en (1) infiltración de células caliciformes en la córnea epitelial y pérdida en la conjuntiva; (2) secreción lagrimal y (3) angiogénesis linfática y/o (4) acumulación de células inflamatorias en tejidos lagrimales.

En el modelo de roedor EDE, se administró crónicamente de manera diaria, cada dos días o semanalmente con una formulación tópica, otra realización que comprende el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o variante o porción de los mismos (SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos), a una dosis por ratón de al menos 1 µg a al menos aproximadamente 500 µg o más si la solubilidad lo permite. La producción de lágrimas, la infiltración de células caliciformes en la córnea epitelial y la pérdida de células caliciformes en la conjuntiva se evaluarán mediante métodos conocidos y los resultados se compararán con los controles.

En modelos de roedores de ojo seco más severos, se administró diariamente, cada dos días o semanalmente con una formulación tópica, otra realización que comprendía el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 o HOX D2 humano o variante o porción de los mismos (por ejemplo, SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) a una dosis por ratón de 20 g de al menos 1 µg a al menos aproximadamente 500 µg o más si la solubilidad lo permite. La angiogénesis linfática y la patología corneal se evaluarán mediante métodos conocidos y los resultados se compararán con los controles.

En seres humanos, se administró crónicamente de manera diaria, cada dos días, o semanal con una formulación tópica, otra realización que comprendía el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humanos o una variante o porción de los mismos (por ejemplo, SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) a una dosis por persona de 70 kg de menos de 1 µg a aproximadamente 100 µg, los cambios en la secreción lagrimal hacia niveles normales en comparación con los sujetos de control que recibieron un tratamiento con placebo se medirán mediante la prueba de Schirmer.

La alopecia areata es una enfermedad cutánea autoinmunitaria común que provoca la pérdida de cabello en el cuero cabelludo y en otras partes del cuerpo. Por lo general, comienza con uno o más parches pequeños, redondos y lisos en el cuero cabelludo y puede progresar hasta la pérdida total del cabello (alopecia total) o la pérdida completa del vello corporal (alopecia universal). La alopecia areata afecta aproximadamente al dos por ciento de la población en general, incluyendo más de 5 millones de personas solamente en los Estados Unidos. Esta enfermedad cutánea común es altamente impredecible y cíclica. El cabello puede volver a crecer o caerse nuevamente en cualquier momento, y el curso de la enfermedad es diferente para cada persona.

Formuladas en un champú apropiado o una formulación tópica para la aplicación al cuero cabelludo y otras zonas involucradas, los autores de la presente invención evaluarán la realización de la proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-NBD o las realizaciones de producto conjugado alternativas que contienen proteína NBD para determinar (1) la respuesta inflamatoria aguas abajo para citocinas derivadas de células T mediante biopsia de la piel, (2) la pérdida de cabello y (3) la regeneración del cabello. En este estudio doble ciego en pacientes con alopecia areata, se tratarán con placebo (formulación tópica solamente) las lesiones señal pareadas en la misma fase de desarrollo de pérdida de cabello y con la formulación que contiene homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano- péptido NBD. El crecimiento del cabello y la inflamación del folículo piloso se medirán en ambas lesiones y se compararán en lesiones no tratadas. En otros estudios de grupos paralelos, se medirán y compararán

la pérdida de cabello y el crecimiento de las lesiones señal y el número de nuevas lesiones entre los grupos de tratamiento.

En modelos de roedores de alopecia areata, por ejemplo, el modelo Dundee Experimental Bald Rat (DEBR), y en pacientes con alopecia areata, la administración crónica diaria, cada dos días o semanalmente con una formulación tópica, una realización que comprende el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o una variante o porción del mismo (SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción del mismo) a una dosificación de menos de aproximadamente 0,01% p/vol a menos de aproximadamente 5% p/vol, se evaluarán la pérdida de cabello y el crecimiento del cabello mediante métodos conocidos en lesiones tratadas versus no tratadas.

Administrada como una formulación i.v. o i.p., los autores de la presente invención evaluarán el efecto del pretratamiento de roedores con realizaciones de la proteína de fusión o producto conjugado de NBD permeabilizante derivado de genes humanos descritos (SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) sobre la lesión por isquemia-reperfusión en modelos animales bien descritos, incluyendo un modelo de accidente cerebrovascular. Específicamente, los autores de la presente invención examinarán mediante técnicas de histopatología conocidas en este modelo de accidente cerebrovascular la zona del tejido necrótico, un indicador de lesión por isquemia-reperfusión.

En el modelo de accidente cerebrovascular en roedores, la administración subaguda comienza en el plazo de 1 hora después del evento isquémico y continúa a intervalos tales como cada 6 horas, 12 horas o diariamente durante uno o tres días) a través de una formulación i.v. o i.p., otra realización que comprende el péptido de carga NBD conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o variante o porción del mismo (SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) a una dosificación de menos de aproximadamente 0,1 mg/kg a menos de aproximadamente 100 mg/kg. La zona de tejido cerebral necrótico en el grupo de tratamiento se evaluará utilizando métodos de histopatología conocidos.

La uveítis es una afección inflamatoria común del ojo. Las muchas versiones de la uveítis pueden ser enfermedades inflamatorias oculares que amenazan la vista. Se cree que la uveorretinitis autoinmunitaria experimental (EAU) es un modelo animal de uveítis humana. Los inmunosupresores utilizados para tratar la uveítis humana son eficaces en tal modelo animal. Además, se informa que la ruta inflamatoria de NF-κB, una diana de las proteínas de fusión de homeodominio-HOX C12 y HOX D12-NBD, está implicada en la patogénesis de EAU. Además, existe una forma concreta de uveítis granulomatosa familiar, el síndrome de Blau, que puede ser causada por mutaciones específicas en el gen NOD2 humano y está directamente asociada con la inflamación por NF-κB.

Se evaluará una realización de proteína de fusión de homeodominio HOX D12 humano-NBD, formulado como una administración tópica en el ojo, para determinar su capacidad para reducir la inflamación de un modelo animal de uveítis. Los ratones con deficiencia de NOD2 reciben una inyección intravítrea de muramil dipéptido (MDP) y se puede medir la respuesta intravascular dentro del iris y se puede evaluar la infiltración celular mediante microscopía e histología intravítrea. O, como prueba preliminar de la eficacia tópica, se puede evaluar la capacidad de las proteínas de fusión para reducir la inflamación ocular causando la administración de la endotoxina LPS en ratones. Se prevé que después de la indicación de eficacia en modelos animales de uveítis, se podrían considerar los ensayos en seres humanos en tipos más comunes de uveítis. Los criterios de valoración clínicos utilizados en los ensayos clínicos de uveítis incluyen el cambio en la turbidez vítrea graduada medio desde el inicio y el cambio medio en las células graduadas de la cámara anterior desde el inicio después de 16 semanas de tratamiento. La prevención del deterioro se demuestra al no observar un aumento en la turbidez vítrea mayor o igual a 2 grados, se demuestra al prevenir un aumento en las células de la cámara anterior mayor o igual a 2 grados o al prevenir un deterioro de la agudeza visual mayor o igual a 0,3 logMAR desde el valor inicial.

En una realización, el efecto del tratamiento en sujetos humanos con una formulación intravenosa del producto conjugado de NBD permeabilizante obtenido de ser humano descrito (SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos) se puede evaluar con respecto a las consecuencias clínicas de inestabilidad de la placa aterosclerótica que conduce a trombosis intravascular y angina inestable, infarto agudo de miocardio y accidente cerebrovascular agudo. En sujetos humanos con síntomas de angina inestable, infarto agudo de miocardio y/o accidente cerebrovascular agudo, la patología subyacente está asociada con la inestabilidad inflamatoria de la placa aterosclerótica con producción de factores protrombóticos por los macrófagos dentro de la lesión aterosclerótica que conducen a la formación de trombos y a la oclusión vascular parcial o completa. Específicamente, la evaluación puede comenzar en la presentación en un centro de cuidados intensivos. La evaluación adicional puede incluir observar/medir los efectos del tratamiento agudo y subagudo durante uno a cinco días sobre los biomarcadores de inflamación tales como la proteína C reactiva (PCR) a las 24 horas de la presentación. Los resultados clínicos, tales como la mortalidad, la función cardíaca (fracción de eyección en el caso de un IM agudo) y la función neurológica (en el caso de un accidente cerebrovascular agudo) medidos con la Escala de Accidentes Cerebrovasculares de los Institutos Nacionales de Salud (NIHSS) se pueden evaluar aproximadamente un mes después de la presentación. El NIHSS es una herramienta de evaluación sistémica que proporciona una medida cuantitativa del déficit neurológico relacionado con el accidente cerebrovascular. Por ejemplo, un paciente con accidente cerebrovascular con un valor

NIHSS inferior a 12-14 tendrá un 80% de posibilidades de obtener un resultado bueno o excelente, mientras que un valor NIHSS superior a 20-26 tiene menos de 20% de posibilidades de obtener un resultado bueno o excelente. Por lo tanto, en estos estudios, el porcentaje de sujetos humanos con una puntuación NIHSS inferior a 17 en un mes se puede utilizar como criterio de valoración para la función neurológica.

En otra realización, se puede evaluar la terapia intravenosa diaria de un producto conjugado de NBD de permeabilización celular derivado de genes humanos (SEQ ID NO: 21 y/o 22, o una porción de los mismos), a dosis diarias de aproximadamente 0,1 mg/kg a menos de aproximadamente 100 mg/kg. Las concentraciones de PCR a las 24 horas se evaluarán en suero mediante métodos conocidos. Además, los autores de la presente invención evaluarán, un mes después de la presentación: (1) la función neurológica posterior al accidente cerebrovascular medida por el porcentaje de pacientes con un NIHSS de menos de 17; (2) el gasto cardíaco post-IM medido por ultrasonido; y (3) los niveles de mortalidad aguda. Los resultados se compararán con los controles.

Las realizaciones alternativas que comprenden cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugados con el péptido NBD incluyen una variedad de proteínas de fusión o productos conjugados que comprenden uno o más conectores conocidos en la técnica, siempre que la función de la proteína de fusión o producto conjugado no se vea comprometido por su adición.

Ejemplo 2

Péptido citoplasmático PC1 con cola C-terminal para la Enfermedad Renal Poliquística

Otra realización de una proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (o variante o porción de los mismos) que inhibe las interacciones proteína-proteína es aquella en la que la segunda región está compuesta por un péptido de 200 aminoácidos cuya secuencia deriva de la región de cola C-terminal citoplasmica de la proteína PC1 (PC1 CTT), también conocida como p200 (Lal et al. "Polycystin-1 C-terminal tail associates with β-catenin and inhibits canonical Wnt Signaling" Hum. Mol. Genet. 17(20):3105-17, 15 de octubre, 2008, incluidos los materiales complementarios). El gen PC1 y/o el gen PC2 están comúnmente mutados en la enfermedad renal poliquística (PKD). Estas mutaciones se heredan o son el resultado de una mutación somática o una combinación de estos eventos y dan como resultado la activación no regulada de genes por un factor de transcripción escindido de la región de la cola citoplasmática C-terminal de la proteína PC1. La proteína p200 bloquea la acción de este factor de transcripción y puede restaurar el desarrollo tubular renal normal en pacientes con PKD si se puede suministrar eficazmente a su sitio de acción dentro de las células tubulares renales.

En una realización, la primera región de la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX C12 humano es:

SEQ ID NO: 1 (Tabla 3):
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la primera región de la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX D12 humano es:

SEQ ID NO: 2 (Tabla 3):
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

y la segunda región conectada es el péptido p200 derivado de la secuencia PC1 CTT; la secuencia de aminoácidos de esta segunda porción es:
SEQ ID NO: 23 (Tabla 3):

VILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGLSKVKEFRHKV
RFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSSQLDGLSVSLGR
LGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQLHSLQGRRSSRA
PAGSSRGPSPGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPLRAKNKVHPSST

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí. Con la adición de una metionina iniciadora, la realización de la secuencia de la proteína de fusión completa que contiene HOX C12 se muestra como SEQ ID NO: 24 (Tabla 3):

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLVILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGL
SKVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSSQ
LDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQLH
SLQGRRSSRAPAGSSRGPSPGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPLRA
KNKVHPSST

y con la adición de una metionina iniciadora, la realización de la secuencia de la proteína de fusión completa que contiene HOX D12 se muestra como SEQ ID NO: 25 (Tabla 3):

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVVILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGLS
KVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSSQL
DGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQLHS
LQGRRSSRAPAGSSRGPSPGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPLRAK
NKVHPSST

Los conectores no son necesarios para la función, pero se pueden incluir conectores entre SEQ ID NO: 1 y 23 o una porción de los mismos o entre SEQ ID NO: 2 y 23, o una porción de los mismos, sin comprometer la función. Se puede utilizar un conector conocido en la técnica, y las realizaciones de SEQ ID NO: 24 y 25 se alterarían, al menos en parte, en la medida en que la secuencia del conector uniera mediante puente las regiones primera y segunda de cada producto conjugado.

En otras realizaciones, el péptido p200 se puede conjugar con cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 19.

En otras realizaciones adicionales más, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales a los extremos amino o carboxi para facilitar la purificación. Tales secuencias pueden incluir etiquetas FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 102), etiquetas myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 103), etiquetas His (HHHHHH) (SEQ ID NO: 80) y otras etiquetas similares conocidas por los expertos en la técnica. Tales etiquetas pueden o no incluir conectores. Además, se pueden utilizar ligandos tales como la proteína aceptora de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 105) junto con la proteína BirA activa. Para secuencias que incluyen una metionina iniciadora N-terminal, si se añade un dominio de purificación N-terminal, la metionina estará en el extremo N-terminal del dominio de purificación en lugar de en el extremo N-terminal del homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano.

La realización de la proteína de fusión que incluye el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos o una variante o porción de los mismos con el péptido PC1 CTT p200 en la segunda región se incluirá en formulaciones sistémicas que incluyen formulaciones de implante intravenoso, subcutáneo, intramuscular e inyectable para liberación sostenida También se pueden formular para incluir estructuras específicas que los dirijan a la recaptación de las células tubulares renales después de que sean filtradas por el glomérulo y entren en la nefrona o a través de receptores específicos como el receptor de vasopresina 2 (V2R, véase más abajo) que pueden dirigirse a las células del quiste renal a través de la sangre. Véase, p. ej., la FIG. 3, que muestra una tercera región que representa tal estructura. Como se señaló, la actividad biológica de la proteína de fusión se puede demostrar *in vitro* en cultivos de células del túbulo renal con mutaciones para PKD donde se inhibe la formación de estructuras similares a quistes, y también en modelos de roedores con PKD donde se inhibe la progresión de la formación de quistes y el crecimiento renal. (Lal et. Al. 2008). Los autores de la presente invención evaluarán el efecto de las realizaciones de la proteína de fusión (SEQ ID NO: 24 o 25, o una porción de los mismos sin la metionina iniciadora, o una realización alternativa de producto conjugado que contiene el péptido PC1 CTT p200) sobre la formación de quistes *in vitro* en estos cultivos de células tubulares renales y también en modelos animales de PKD (p. ej., ratones transgénicos Pkd1 (Pkd2W525/-)). En este modelo de ratón transgénico para PKD-1 los autores de la presente invención medirán, mediante ultrasonido, la inhibición del aumento del tamaño del riñón (es decir, inhibición del crecimiento renal). En pacientes con PKD, utilizando formulaciones farmacéuticas de una o más de las realizaciones de proteínas de fusión y/o productos conjugados descritas que comprenden el péptido PC1 CTT p200 en la segunda región, los autores de la presente invención evaluarán mediante MRI el volumen total del riñón y la progresión del tamaño y número de quistes.

En otra realización de una proteína de fusión o producto conjugado que contiene el péptido CTT PC1 para el tratamiento de PKD, la segunda región de la proteína es p21, una porción de la molécula p200 que conserva algunas pero no todas las actividades biológicas de p200. Véase la Tabla 3, SEQ ID NO: 26. El péptido p21 cuando se expresa genéticamente en cultivos celulares de túbulos renales de PKD descritos anteriormente restaura el fenotipo de tipo túbulo normal en las células de una manera similar al efecto de la expresión del péptido p200

completo en estas células. La eliminación de los aminoácidos p21 de la construcción de p200 también elimina la capacidad de expresión de p200 para corregir el fenotipo de quiste de estas células en cultivo. A diferencia de p200, p21 no activa la ruta de señalización de Wnt y, por lo tanto, puede no inducir actividad osteoblástica. Estas diferencias se pueden medir in vivo utilizando biomarcadores de formación ósea osteoblástica como la osteocalcina en modelos de ratón de PKD donde los efectos beneficiosos sobre la progresión de la formación de quistes renales y el tamaño de los riñones también se pueden medir por ultrasonido.

La secuencia de aminoácidos de la primera región del homeodominio HOX C12 humano de 60 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) se ha mostrado anteriormente. La secuencia de aminoácidos de esta segunda región p21 (SEQ ID NO: 26) es:

IRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR.

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí.

Ciertas realizaciones, tales como proteínas de fusión que contienen HOX C12 y HOX D12, cada una con una metionina iniciadora, se muestran en SEQ ID NO: 27 y 28, respectivamente, a continuación, y en la Tabla 3.

SEQ ID NO: 27:
MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLIRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR
SEQ ID NO: 28:
MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVIRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR

Los conectores no son necesarios para la función, pero se pueden incluir conectores, por ejemplo, entre SEQ ID NO: 1 y 27 o 28, y entre SEQ ID NO: 2 y 27 o 28 sin comprometer la función. Se puede utilizar cualquier conector conocido en la técnica, y las realizaciones de SEQ ID NO: 27 y 28 se alterarían, al menos en parte, en la medida en que la secuencia del conector uniera por puente estas regiones primera y segunda.

En otras realizaciones, el péptido p21 se puede conjugar con cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 19.

En el modelo de ratón transgénico para PKD-1, los autores de la presente invención evaluarán mediante ultrasonidos el efecto de inyección i.p. o i.v. diaria crónica de formulaciones que incluyen (1) la realización de la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200 de los autores de la presente invención y (2) la realización de la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 sobre el tamaño del riñón.

En el modelo de ratón transgénico para PKD-1, una realización que comprende el péptido de carga PC1 CTT (p200 (SEQ ID NO: 23) o p21 (SEQ ID NO: 26)) conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (como SEQ ID NO: 27 y 28 en el caso de p21, y como SEQ ID NO: 24 y 25 en el caso de p200), o una realización alternativa que contiene péptido PC1 CTT que varía según el tipo de conector, si lo hay, a una dosis por ratón de al menos aproximadamente 1 µg a al menos 500 µg o más si la solubilidad lo permite. El tamaño del riñón y la tasa de crecimiento se evaluarán por ultrasonidos, y los resultados del grupo que recibe la formulación de tratamiento con homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 se compararán con los del grupo control y el grupo que recibe la formulación de tratamiento con proteína de fusión o el producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200.

En el modelo de ratón transgénico para PKD-1, los autores de la presente invención evaluarán adicionalmente la capacidad de otra realización que comprende el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano- p21 y las proteínas de fusión o productos conjugados de homeodominio HOX C12 u HOX D12-p200 humano para reducir el crecimiento renal en comparación con el grupo de control, y para comparar el efecto de los cambios tanto en el homeodominio humano-p21 como en el homeodominio humano-p200 en los biomarcadores óseos osteoblásticos, tales como la osteocalcina en sangre como comparación. Las realizaciones de proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 y la proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200 se administrarán en una formulación a una dosis por ratón de al menos aproximadamente 1 µg a al menos 500 µg o más si la solubilidad lo permite. La concentración de osteocalcina en sangre se evaluará mediante métodos conocidos, y los resultados del grupo que recibe realizaciones tales como la formulación de tratamiento con homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 se compararán con los del grupo de control y el grupo que recibe realizaciones tales la como la formulación de tratamiento con la proteína de fusión o el producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200.

En pacientes con PKD tratados sistémicamente con una dosificación diaria crónica de las formulaciones descritas

anteriormente, las realizaciones que comprenden el péptido de carga PC1 CTT (p200 (SEQ ID NO: 23) o p21 (SEQ ID NO: 26) o una porción de los mismos) conjugado a través de un enlace peptídico con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o una variante o porción de los mismos (p. ej., con las realizaciones de secuencia completa como SEQ ID NO: 27-28, o una variante o porción de los mismos, en el caso de p21, y como realizaciones de secuencia completa como SEQ ID NO: 24-25, o una variante o porción de los mismos, en el caso de p200) o una realización de producto conjugado que contiene el péptido PC1 CTT alternativa que varía según el tipo de conector, si lo hay, se administrará a una dosis de menos de aproximadamente 0,01 mg/kg a menos de aproximadamente 100 mg/kg. La tasa de crecimiento del riñón se evaluará mediante métodos conocidos, y los resultados del grupo que recibe la realización de la formulación de tratamiento con homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 se compararán con los del grupo de control y el grupo que recibe la realización de la formulación de tratamiento con la proteína de fusión o el producto conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200. realización de formulación de tratamiento de conjugado o proteína de fusión -p200.

Elección como diana de los quistes renales: Se cree que los conductos colectores renales son el origen de algunos o la mayoría de los quistes en la PKD. Las células del conducto colector expresan el receptor 2 de vasopresina (V2R). Puede ser posible dirigir las realizaciones de proteína de fusión y producto conjugado con un péptido de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o una variante o porción de los mismos en la primera región y p200 o p21 en la segunda región a los quistes renales que se originan a partir del conducto colector mediante la inclusión en algunas realizaciones de un antagonista del péptido V2R unido o mediante la adición de un antagonista del péptido V2R como un segmento adicional de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, se puede utilizar un conector extraíble si la función del producto conjugado no se ve comprometida con su adición. Un ejemplo de un antagonista del péptido V2R no competitivo fue referido por Rihakova et al. "VRQ397 (CRAVKY): a novel noncompetitive V2 receptor antagonist" Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol 297: R1009-R1018, 2009. ("CRAVKY" descrito como SEQ ID NO: 29). Los autores de la presente invención pretenden someter a prueba la adición de VRQ397 (CRAVKY) (SEQ ID NO: 29, que se muestra en la Tabla 3), un antagonista del péptido V2R no competitivo, al extremo N-terminal o C-terminal de las realizaciones de la proteína de fusión (producto conjugado) de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200 y/u homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 con un conector diseñado para desconectarse o disolverse una vez que la región expuesta del homeodominio humano haya facilitado la entrada en la célula al citoplasma para evaluar la dosificación necesaria para la eficacia (tal como el cambio en el tamaño del riñón), así como la eficacia del suministro en el sitio de acción. Adicionalmente, los autores de la presente invención examinarán si el antagonista del péptido V2R afecta a la eficacia de la realización de la proteína de fusión o producto conjugado a través de un mecanismo diferente.

SEQ ID NO: 29 (Tabla 3): Antagonista seis aminoácidos del péptido V2R: CRAVKY.

En diversas realizaciones, los péptidos dirigidos para el tratamiento de la PKD pueden ser cualquiera de los siguientes: CRAVKY-(conector)-p200-homeodominio humano ("CRAVKY" descrito como SEQ ID NO: 29); CRAVKY-(conector)-p21-homeodominio humano ("CRAVKY" descrito como SEQ ID NO: 29); homeodominio humano-p200-(conector)-CRAVKY ("CRAVKY" descrito como SEQ ID NO: 29); homeodominio humano-p21-(conector)-CRAVKY ("CRAVKY" descrito como SEQ ID NO: 29) donde la secuencia CRAVKY (SEQ ID NO: 29) está en el extremo N-terminal de la proteína en los primeros dos ejemplos y en el extremo C-terminal de la proteína en los dos segundos ejemplos.

La actividad relativa de las realizaciones que comprenden, por ejemplo, péptidos p21 y p200 con y sin el péptido CRAVKY conectado (SEQ ID NO: 29) se puede evaluar *in vitro* en cultivos de células de quistes de PKD como se describió anteriormente, siempre que estas células estén modificadas por ingeniería genética para expresar también V2R sobre su superficie. La respuesta a la dosis *in vitro* para las diversas realizaciones de proteína de fusión o de producto conjugado que contienen CRAVKY ("CRAVKY" descrito como SEQ ID NO: 29), por ejemplo, más arriba se pueden comparar con las mismas realizaciones de proteína de fusión o de producto conjugado sin CRAVKY (SEQ ID NO: 29) para determinar su capacidad para cambiar el fenotipo *in vitro* de los cultivos celulares de tipo quiste a tipo túbulo. Además, estas construcciones también se pueden someter a prueba en el modelo de PKD murina descrito anteriormente para determinar su capacidad relativa para reducir el crecimiento del tamaño del riñón.

Si se observa (1) eficacia de las realizaciones de formulación la proteína de fusión o el producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p21 y/o de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-p200 en los cultivos de células quísticas de PKD, y (2) mayor potencia (es decir, un desplazamiento en la curva de dosis-respuesta hacia la izquierda) en el modelo de ratón transgénico para PDK-1 descrito anteriormente cuando se dirige utilizando el péptido CRAVKY (SEC ID NO: 29), al menos una de las realizaciones de secuencia descritas anteriormente que comprende SEQ ID NO: 29 se someterá a prueba en el modelo de ratón transgénico para PDK-1, así como en pacientes afectados en lugar de SEQ ID NO: 24, 25, 27 y/o 28 (o una variante o porción de los mismos), o su contrapartes conjugadas. La tasa de crecimiento renal se evaluará mediante métodos conocidos.

Las descripciones alternativas, incluidas las que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugadas con (1) el péptido p200 o (2) el péptido p21 incluyen una variedad de proteínas

de fusión o productos conjugados que comprenden uno cualquiera o más conectores conocidos en la técnica siempre que la función no se vea comprometida, y pueden comprender adicionalmente el péptido CRAVKY (SEQ ID NO: 29).

Ejemplo 3

Terapia de reemplazo de enzimas de péptidos que pueden penetrar en las células para la Enfermedad de Almacenamiento Lisosomal

Existe una fuerte evidencia de que los péptidos que pueden penetrar en las células pueden permitir que los péptidos o proteínas de "carga" grandes, tales como los anticuerpos, entren en las células. Las realizaciones de productos conjugados o proteínas de fusión que comprenden un péptido derivado de HOX u otros péptidos que pueden penetrar en las células de homeodominio humano, tales como los descritos de manera similar, pueden acompañar a moléculas más grandes a través de las membranas celulares hacia los sitios de acción intracelulares. También reducen la inmunogenicidad de los péptidos y proteínas de carga de otro modo antigénicos, y les permiten atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en el SNC. Las realizaciones descritas y sus modificaciones, por lo tanto, también incluyen realizaciones en las que la primera región del producto conjugado o la proteína de fusión es el homeodominio humano de 60 aminoácidos o una variante o porción del mismo, y la segunda región es una enzima activa. Estos compuestos restaurarán la función enzimática en pacientes con deficiencias enzimáticas hereditarias, tal como en las enfermedades de almacenamiento lisosómico. Los autores de la presente invención incluyen tres ejemplos de enfermedad de almacenamiento lisosomal y estructuras de "carga" asociadas ((1) glucocerebrosidasa (GCasa), por ejemplo, como se muestra en SEQ ID NO: 30, para la enfermedad de Gaucher, (2), alfa-L-iduronidasa, para ejemplo, como se muestra en SEQ ID NO: 45, para el síndrome de Hurler; y (3) iduronato-2-sulfatasa, por ejemplo, como se muestra en SEQ ID NO: 48, para el síndrome de Hunter), los mismos principios se aplican a las proteínas de fusión o productos conjugados del homeodominio humano con otras enzimas de "carga" que están ausentes o son defectuosas en las otras enfermedades de almacenamiento lisosómico.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico generalmente se clasifican según la naturaleza del material almacenado primario involucrado, y se pueden dividir en términos generales en las siguientes: (los códigos ICD-10 se proporcionan cuando se encuentran disponibles).

- (E75) trastornos de almacenamiento de lípidos, principalmente esfingolipidosis (incluyendo las enfermedades de Gaucher y Niemann-Pick (E75.0-E75.1) gangliosidosis (incluyendo la enfermedad de Tay-Sachs (E75.2), leucodistrofias.
- (E76.0) mucopolisacaridosis (incluyendo el síndrome de Hunter y la enfermedad de Hurler)
- (E77) trastornos de almacenamiento de glucoproteínas
- (E77.0-E77.1) mucolipidosis

Asimismo, la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (enfermedad de Pompe) también es un defecto en el metabolismo lisosómico, aunque de otro modo se clasifica en E74.0 en ICD-10.

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es un trastorno hereditario del almacenamiento lisosómico causado por la ausencia o mutación del gen GBA 1, que a su vez conduce a una deficiencia en el producto GBA1, glucocerebrosidasa (GCasa). La administración intravenosa de GCasa alivia algunos síntomas de Gaucher en pacientes. Una deficiencia de GCasa también contribuye a algunas formas hereditarias de la enfermedad de Parkinson.

En una realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX C12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 1 (Tabla 3):
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX D12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 2 (Tabla 3):
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

y en algunas realizaciones, la segunda porción conectada es la secuencia de aminoácidos de GCasa:

SEQ ID NO: 30 (Tabla 3):
ARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMEL
SMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNL
LLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLK
IPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLKGQPGDIYHQT
WARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRD
FIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAV
HWYLDFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRG
MQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFY
KQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVVVLNR
SSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí. En otra realización con la adición de una metionina iniciadora, la secuencia peptídica completa de la proteína de fusión con HOX C12 es

SEQ ID NO: 31 (Tabla 3):
MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYE
STRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAAL
NILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLH
NFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSL
KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQ
CLGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDP
EAAKYVHGIAVHWYLDFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQ
SVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDS
PIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPD
GSAVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

Con la adición de una metionina iniciadora en otra realización más, la secuencia peptídica completa de la proteína de fusión con HOX D12 es

SEQ ID NO: 32 (Tabla 3):
MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYES
TRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNI
LALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNF
SLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLKG
QPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLG
FTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAA
KYVHGIAVHWYLDFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVR
LGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIV
DITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS
AVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

Los conectores pueden no ser necesarios para la función, pero se pueden incluir conectores en ciertas realizaciones, por ejemplo, entre SEQ ID NO: 1 y 30 o entre SEQ ID NO: 2 y 30 sin comprometer la función. Se

puede utilizar cualquier conector conocido en la técnica siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida con su adición. Las realizaciones de SEQ ID NO: 31 y 32, o variantes o porciones de los mismos se alterarían, al menos en parte, en la medida en que la secuencia conectora uniera por puente las regiones primera y segunda en cada una.

La glicosilación de proteínas también se puede alterar en la estructura final. La exposición de la manosa en varios sitios de glicosilación puede mejorar el direccionamiento lisosómico de realizaciones incluyendo, por ejemplo, SEQ ID NO: 31 y/o 32 o variantes o porciones de los mismos.

En otras realizaciones adicionales, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales a los extremos amino o carboxi para facilitar la purificación. Tales secuencias pueden incluir etiquetas FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 102), etiquetas myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 103), etiquetas His (HHHHHH) (SEQ ID NO: 80) y otras etiquetas similares conocidas por los expertos en la técnica. Tales etiquetas pueden o no incluir conectores. Además, se pueden utilizar ligandos tales como la proteína aceptora de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 105) junto con la proteína BirA activa. Para secuencias que incluyen una metionina iniciadora de N-terminal, si se añade un dominio de purificación N-terminal, la metionina estará en el extremo N-terminal del dominio de purificación en lugar de en el extremo N-terminal del homeodominio humano o primera región del péptido HOX.

Las realizaciones de productos conjugados o proteínas de fusión que incluyen un homeodominio humano o una variante o porción del mismo y, por ejemplo, la secuencia de GCasa en la segunda región se incluirán en formulaciones sistémicas que incluyan formulaciones de implante intravenoso, subcutáneo, intramuscular e inyectable para liberación sostenida. En los modelos murinos de la enfermedad de Gaucher donde las mutaciones humanas se incorporan a la secuencia de la GCasa de ratón, estas proteínas de fusión evitan la acumulación de sustrato en diversos tejidos y evitan las manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Gaucher.

Los autores de la presente invención examinarán la inmunogenicidad de las realizaciones de producto conjugado o proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos humanos (o una variante o porción de los mismos) utilizando ensayos de proliferación de linfocitos que son bien conocidos en la técnica. Para estudiar la capacidad general, por ejemplo, del homeodominio humano de 60 aminoácidos o una variante o porción del mismo para eliminar la inmunogenicidad de proteínas de otro modo inmunogénicas, se incuban *in vitro* células mononucleares humanas aisladas de sujetos inmunes al toxoide tetánico durante tres días con toxoide tetánico o productos conjugados de péptido de homeodominio humano (o variante o porción del mismo)-toxoide tetánico a diversas concentraciones que se van a determinar, que varían de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 115 µM. A continuación, se determinará la incorporación de 3H-timidina por los linfocitos en los cultivos.

Además, los autores de la presente invención evaluarán la inmunogenicidad de las realizaciones de proteínas de fusión o productos conjugados enzimáticos *in vitro* Específicamente, los leucocitos mononucleares se aislarán de pacientes con reacciones de infusión conocidas y formación de anticuerpos contra la enzima. Utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, estas células se incubarán *in vitro* con medios solos y con diversas concentraciones de la formulación enzimática patrón y con diversas concentraciones de las realizaciones de proteína de fusión y/o producto conjugado de péptido de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano tales como la secuencia o variante de GCasa o una porción de la misma, por ejemplo, entre 1 µM y aproximadamente 115 µM. La incorporación de 3H-timidina por los linfocitos se determinará como una medida de la respuesta inmunitaria de los linfocitos.

Por ejemplo, se evaluarán las pruebas in vitro de las realizaciones de la proteína de fusión que comprenden el péptido de carga GCasa conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos o variante o porción del mismo (p. ej., realizaciones que comprenden SEQ ID NO: 24, 25, 27 y/o 28, o variantes o porciones de los mismos). En una realización, los autores de la presente invención compararán la inmunogenicidad de los productos conjugados o proteínas de fusión de homeodominio humano de 60 aminoácidos que contienen el péptido GCasa con la inmunogenicidad de la enzima sola utilizando ensayos de proliferación de linfocitos de leucocitos mononucleares humanos aislados de pacientes con reacciones a la infusión mediadas por el sistema inmunitario conocidas cuando son tratados con enzima sola Después de la incubación *in vitro* durante tres a cinco días a una concentración micromolar óptima a determinar, se evaluará la inmunogenicidad de las realizaciones que comprenden los productos conjugados o proteínas de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos (o variantes o porciones de los mismos) examinando la incorporación de 3H-timidina por los linfocitos, y los resultados se compararán con los controles.

Más adelante en las pruebas clínicas, se evaluarán diversas realizaciones que comprenden proteínas de fusión o conjugados productos conjugados de péptidos de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humanos que incluyen la secuencia de GCasa en función de sus capacidades para restaurar la función sin reacciones a la infusión clínicamente significativas o producción de anticuerpos anti-GCasa funcionalmente importante.

Hay dos ejemplos de ensayos celulares que se pueden utilizar para determinar que una realización de producto conjugado de homeodominio humano-GCasa es eficaz y a qué concentración. En células normales, por ejemplo,

fibroblastos en cultivo, la adición del sustrato para GCasa da como resultado la activación de la enzima y la reducción del sustrato (que se acumula en la enfermedad de Gaucher). En fibroblastos con genes GBA 1 defectuosos o ausentes, la adición del sustrato para GCasa no conduce a la renovación del sustrato. Sin embargo, en cultivos con estas células, la adición de cantidades crecientes de homeodominio humano-GCasa con residuos de manosa expuestos o productos conjugados de homeodominio humano-GCasa suministra más enzima a la célula y disminuye, por ejemplo, el sustrato radiomarcado. Alternativamente, en células tomadas de pacientes de Gaucher, por ejemplo, leucocitos, un ensayo fluorométrico de beta-glucosidasa determina la actividad relativa de GCasa como diagnóstico de la enfermedad, y también se puede utilizar como ensayo de células humanas para demostrar la eficacia de realizaciones tales como la proteína de fusión o el producto conjugado de homeodominio humano-GCasa en la restauración de la actividad enzimática.

En los cultivos celulares de fibroblastos con mutaciones del gen Gba1, el péptido de carga GCasa (por ejemplo, SEQ ID NO: 30) conjugado como una proteína de fusión con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (por ejemplo, cualquiera de los SEQ ID NO: 1 y/o 2 o una porción del mismo) será activo en este ensayo *in vitro* a diversas concentraciones entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 115 µM. Los autores de la presente invención medirán la acumulación del sustrato de GCasa, glicosilceramida, en comparación con la de los cultivos de control.

Las mutaciones puntuales en el gen GBA1 de ratones han producido un modelo confiable de la enfermedad de Gaucher. Los autores de la presente invención evaluarán hasta durante dos meses la administración i.v. o i.p. diaria de una realización que comprende la proteína de fusión o el producto conjugado de homeodominio humano-GCasa para reducir la acumulación de glucosilceramida (el sustrato de GCasa) en este modelo murino. El péptido de carga GCasa (por ejemplo, SEQ ID NO: 30) conjugado como una proteína de fusión con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 1 y/o 2 o una porción de los mismos) se administrará a una dosis por ratón entre al menos aproximadamente 1 µg y al menos aproximadamente 500 µg o más. Nuevamente, los autores de la presente invención evaluarán la acumulación del sustrato de GCasa, glucosilceramida, en comparación con la del grupo control.

En otro modelo de ratón de la enfermedad de Gaucher con afectación del sistema nervioso central, la acumulación de inclusiones de α-sinucleína y tau se produce en regiones del cerebro y son características de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, las mutaciones puntuales individuales en el locus Gba1 murino (Gba1D409V/D409V) provocan la acumulación de añadidos de α-sinucleína/ubiquitina en el SNC y un déficit medible en la memoria del hipocampo. En este modelo de ratón los autores de la presente invención evaluarán la capacidad de las realizaciones que comprenden la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-GCasa para cruzar la barrera hematoencefálica y liberar enzima capaz de prevenir las asociaciones estructurales de la enfermedad de Parkinson, con el objetivo de reducir acumulación de añadidos de α-sinucleína/ubiquitina en el cerebro, en comparación con la administración sistémica de la enzima pura. En este modelo de ratón de la enfermedad de Gaucher, el péptido de carga GCasa (por ejemplo, SEQ ID NO: 30) conjugado como una proteína de fusión al homeodominio humano (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o una porción de los mismos) se administrará por vía intravenosa o intraperitoneal hasta durante dos meses a una dosis por ratón de al menos aproximadamente 1 µg a al menos aproximadamente 500 µg. Los autores de la presente invención evaluarán la acumulación de los añadidos de α-sinucleína/ubiquitina en el cerebro mediante métodos conocidos en comparación con los del grupo de control.

Las realizaciones alternativas tales como cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugadas con el péptido GCasa incluyen una variedad de proteínas de fusión o productos conjugados que comprenden uno o más conectores conocidos en la técnica, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida.

Síndrome de Hurler

Otra enfermedad de almacenamiento lisosómico, el síndrome de Hurler, la mucopolisacaridosis I (MPS I), es una de las mucopolisacaridosis, un grupo de trastornos hereditarios causados por la falta de enzimas lisosómicas específicas involucradas en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAG) o mucopolisacáridos. La acumulación de GAG parcialmente degradados causa interferencias con la función celular, tisular y orgánica. El síndrome de Hurler se debe a una deficiencia hereditaria de la alfa-L-iduronidasa debido a la estructura anormal del gen IDUA o la regulación del gen IDUA y puede dar lugar a una amplia gama de implicación fenotípica con 3 entidades clínicas reconocidas principales: síndrome de Hurler (MPS IH), de Scheie (MPS IS; 607016) y de Hurler-Scheie (MPS IH/S). Los síndromes de Hurler y Scheie representan fenotipos en los extremos severos y leves del espectro clínico de MPS I, respectivamente, y el síndrome de Hurler-Scheie es intermedio en la expresión fenotípica.

La mucopolisacaridosis 1H (MPS1 H) es una forma grave de mucopolisacaridosis tipo 1 que se caracteriza por un deterioro físico progresivo con excreción urinaria de dermatán sulfato y heparán sulfato. Los pacientes con MPS1 H generalmente presentan, dentro del primer año de vida, una combinación de hepatoesplenomegalia, deformidades

esqueléticas, opacidad corneal y retraso mental severo. La enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, la infección respiratoria y las complicaciones cardíacas generalmente provocan la muerte antes de los 10 años de edad.

La mucopolisacaridosis 1H/S (MPS1H/S) es una forma de mucopolisacaridosis tipo 1 caracterizada por un deterioro físico progresivo con excreción urinaria de dermatán sulfato y heparán sulfato. MPS1H/S representa un fenotipo intermedio del espectro clínico de MPS1. Se caracteriza por una participación neurológica relativamente pequeña, pero la mayoría de los síntomas somáticos descritos para la MPS1 grave se desarrollan a principios y mediados de la adolescencia, lo que causa una pérdida considerable de movilidad.

La mucopolisacaridosis 1S (MPS1S) es una forma leve de mucopolisacaridosis tipo 1 caracterizada por un deterioro físico progresivo con excreción urinaria de dermatán sulfato y heparán sulfato. Los pacientes con MPS1S pueden tener poca o ninguna afectación neurológica, estatura normal y vida útil, pero presentan desarrollo de rigidez en las articulaciones, hepatoesplenomegalia leve, enfermedad valvular aórtica y opacidad corneal.

Aquí los autores de la presente invención se refieren a todos estos fenotipos clínicos como síndrome de Hurler o MPS I. Éste es más frecuente que MPS II (síndrome de Hunter), que no tiene opacidad corneal y sigue un curso más lento (véase más abajo).

En una realización, la primera región de la secuencia de aminoácidos de HOX C12 es SEQ ID NO: 1:

SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la primera región de la secuencia de aminoácidos de HOX D12 es SEQ ID NO: 2:

ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

La segunda región puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 45 (Tabla 3), la secuencia de 653 aminoácidos de Alfa-L-iduronidasa (incluido el péptido señal de 27 aminoácidos):

MRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARALWPLRRFWRSTG
FCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGS
TGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEW
KDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVSMTMQGFLNYY
DACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEA
GVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVG
WSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLSNDNAFLSYH
PHPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQ
AGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTL
RLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQFRRMRAAE
DPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLT
QGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPDT
GAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí. Y la secuencia completa de esta realización que incluye el homeodominio HOX C12 con una metionina iniciadora puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 46 (Tabla 3):

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLMRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARALW
PLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTH
WLLELVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTD
FEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVS
MTMQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCH
DGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIY
NDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLS
NDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEE
QLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAH
PNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAE
QFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLVHVCARPEKPPGQ
VTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPST
FNLFVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPG
NP

La secuencia completa de otra realización que incluye el homeodominio HOX D12 con una metionina iniciadora puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 47 (Tabla 3):

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVMRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARALWP
LRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHW
LLELVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFE
DKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVSMT
MQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDG
TNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYND
EADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLSND
NAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQL
WAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPN
RSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQF
RRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLVHVCARPEKPPGQVT
RLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFN
LFVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP

En algunas realizaciones, la glicosilación de proteínas también se puede alterar en la estructura final. La exposición de la manosa en varios sitios de glicosilación puede mejorar el direccionamiento lisosómico de una realización de proteína de fusión o producto conjugado que contiene alfa-L-iduronidasa.

Las realizaciones de la proteína de fusión y el producto conjugado compuesto por el homeodominio humano de 60 aminoácidos o una variante o porción del mismo y la enzima alfa-L-iduronidasa activa o una realización de proteína de fusión o producto conjugado alternativa que contiene alfa-L-iduronidasa con uno o más conectores serán evaluadas en un modelo de ratón para determinar sus capacidades para alcanzar (1) sitios de GAG acumulados en (1) tejido cerebral, (2) condrocitos dentro del cartílago articular y (3) el cartílago de la placa de crecimiento de los huesos largos.

El modelo de ratón con una modificación genética para activar expresión un gen ("knock-in") de MPS 1-H del síndrome de Hurler porta una mutación que es análoga a la mutación encontrada en los pacientes con síndrome de Hurler (IDUA-W402X); los ratones MPS 1-H muestran un fenotipo de anomalías bioquímicas, metabólicas y morfológicas que se correlacionan con las anomalías de los modelos animales con síndrome de Hurler previamente utilizados, y con las anomalías en la forma más severa de deficiencia de alfa-L-iduronidasa en estos pacientes.

Wang y col. "Characterization of an MPS 1-K Knock-in mouse that carries a nonsense mutations analogous to the human IDUA-W402X mutation" Molecular Genetics and Metabolism 99:62-71, 2010.

En este modelo los autores de la presente invención administrarán inyecciones i.v. o i.p. de una realización de formulación que comprende la enzima alfa-L-iduronidasa conjugada con el homeodominio humano o variante o porción del mismo, o una realización de proteína de fusión o producto conjugado alternativa que contiene alfa-L-iduronidasa con uno o más conectores a una dosis por ratón de 1 µg a al menos 500 µg, si la solubilidad lo permite. Los autores de la presente invención evaluarán la acumulación de GAG (heparán sulfato y dermatán sulfato) utilizando técnicas de histopatología, y compararán estos resultados con los resultados de un grupo de control.

En pacientes con síndrome de Hurler, los autores de la presente invención evaluarán los efectos de las realizaciones de la proteína de fusión o el producto conjugado que comprenden la enzima alfa-L-iduronidasa activa sobre la acumulación de GAG midiendo la reducción de la excreción urinaria de GAG, incluyendo el heparán sulfato y el dermatán sulfato. Específicamente, los pacientes con síndrome de Hurler serán tratados sistémicamente con una dosificación diaria crónica de las realizaciones de formulación que comprenden la enzima alfa-L-iduronidasa conjugada con un homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos o una variante o porción del mismo, o una realización de proteína de fusión o producto conjugado que contiene alfa-L-iduronidasa alternativa con uno o más conectores a una dosis de menos de aproximadamente 0,01 mg/kg a menos de aproximadamente 100 mg/kg. La excreción de GAG en orina (heparán sulfato y dermatán sulfato) se evaluará mediante métodos conocidos, y los resultados se compararán con los pacientes que recibieron una realización de formulación que comprende la enzima alfa-L-iduronidasa que no está en forma de proteína de fusión o producto conjugado. Adicionalmente, los autores de la presente invención evaluarán el desarrollo esquelético y cerebral evaluado mediante técnicas pediátricas de crecimiento y desarrollo convencionales.

Se someterán a prueba diversas realizaciones que comprenden la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-alfa-L-iduronidasa *in vitro* en cultivos de líneas celulares de fibroblastos con mutaciones homocigóticas del gen IDUA como ocurre en pacientes nacidos con síndrome de Hurler. En estos cultivos, se medirá el recambio de GAG con y sin una realización de proteína de fusión o producto conjugado para confirmar la enzima activa y la reducción de la acumulación lisosómica de dermatán sulfato y heparán sulfato.

En los cultivos celulares de fibroblastos con mutaciones homocigotas del gen IDUA, una realización que comprende la proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-alfa-L-iduronidasa, o una realización de proteína de fusión producto conjugado alternativa que contiene alfa-L-iduronidasa que comprende uno o más conectores, estarán activos en este ensayo *in vitro* a una concentración óptima entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 115 µM. Nuevamente, los autores de la presente invención medirán la acumulación de sustratos de GAG, dermatán sulfato y heparán sulfato, y compararán sus resultados con cultivos de control.

Los autores de la presente invención evaluarán adicionalmente la inmunogenicidad de las realización de proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-alfa-L-iduronidasa en cultivos de linfocitos utilizando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con MPS I con reacciones a la infusión documentadas mientras recibían terapia de reemplazo con enzimas.

En una realización, los autores de la presente invención compararán la inmunogenicidad de los productos conjugados o proteínas de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos (o variantes o porciones de los mismos) que contienen el péptido alfa-L-iduronidasa con la inmunogenicidad de la enzima sola utilizando ensayos de proliferación de linfocitos en leucocitos mononucleares humanos aislados de pacientes con reacciones alérgicas (infusión) conocidas cuando reciben terapia convencional de reemplazo de enzima alfa-L-iduronidasa. La incorporación de 3H-timidina se mide después de la incubación *in vitro* durante tres a cinco días a una concentración óptima de enzima entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 115 µM. La inmunogenicidad de una realización que comprende el producto conjugado o proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos se evaluará examinando la incorporación de 3H-timidina por los linfocitos, y los resultados se compararán con los del grupo de tratamiento que recibe solo la enzima.

La inmunogenicidad de las realizaciones de la proteína de fusión y/o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-enzima en la medicina clínica se comparará con la de las proteínas de reemplazo de enzima convencionales comparando la aparición de reacciones alérgicas a la infusión alérgica y la producción de anticuerpos IgG anti-enzima.

Las realizaciones alternativas que comprenden, por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugados con el péptido α-L-iduronidasa incluyen una variedad de realizaciones de proteínas de fusión o productos conjugados, y pueden comprender adicionalmente uno cualquiera o más conectores conocidos en la técnica, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida con la adición de uno o más conectores.

Síndrome de Hunter

El síndrome de Hunter o mucopolisacaridosis II (MPS II) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X poco frecuente causado por la deficiencia de la enzima lisosómica iduronato-2-sulfatasa, que conduce a la acumulación progresiva de glicosaminoglicanos en casi todos los tipos de células, tejidos y órganos. Los pacientes con MPS II excretan cantidades excesivas de sulfato de condroitina B (dermatán sulfato) y sulfato de heparitina (heparán sulfato) en la orina. La MPS II es un trastorno multisistémico. La mayoría de los niños con MPS2 tienen una forma grave con anomalías somáticas tempranas que incluyen deformidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia y deterioro cardiopulmonar progresivo. Una característica destacada es el daño neurológico que se presenta como retraso del desarrollo e hiperactividad, pero progresa a retraso mental y demencia. Mueren antes de los 15 años de edad, generalmente como resultado de enfermedad obstructiva de las vías respiratorias o insuficiencia cardíaca. En contraste, aquellos con una forma leve de MPS2 pueden sobrevivir hasta la edad adulta, con complicaciones somáticas atenuadas y a menudo sin retraso mental (Wraith, J. E. et al. "Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy" Europ. J. Pediat. 167:267-277, 2008).

En una realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX C12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 1 (Tabla 3):
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX D12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 2 (Tabla 3):
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

Y la segunda región puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 48, la enzima Iduronato-2-sulfatasa (550 aminoácidos, incluida la secuencia señal de 25 aminoácidos):

MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRPSLG
CYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLY
DFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSW
SFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQ
AIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPD
GLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDT
QVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIF
YVPGRTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAG
LAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYS
QYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDI
HAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí. La realización de la secuencia de aminoácidos completa de la primera (HOX C12) y la segunda regiones combinadas con una metionina iniciadora es, por ejemplo, SEQ ID NO: 49:

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLMPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLI
IVDDLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTG
RRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNH
TDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL
PDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITL
APDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKIRQSYF
ASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDV
ATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVS
LFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGN
PRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDE
FLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

La realización de la secuencia de aminoácidos completa de la primera (HOX D12) y la segunda regiones combinadas con una metionina iniciadora es, por ejemplo, SEQ ID NO: 50:

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVMPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLII
VDDLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTG
RRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNH
TDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL
PDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITL
APDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKIRQSYF
ASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDV
ATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVS
LFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGN
PRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDE
FLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

En algunas realizaciones, la glicosilación de proteínas también se puede alterar en la estructura final. La exposición de la manosa en varios sitios de glicosilación puede mejorar el direccionamiento lisosómico de las realizaciones de la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-iduronato-2-sulfatasa.

En los cultivos celulares de fibroblastos con mutaciones homocigóticas del gen IDS, una realización tal como la proteína de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-iduronato-2-sulfatasa, o la realización alternativa de proteína de fusión o producto conjugado que contiene iduronato-2-sulfatasa que comprende uno o más conectores, serán activas en este ensayo *in vitro* a diversas concentraciones entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 115 µM. Nuevamente, los autores de la presente invención medirán la acumulación de sustratos GAG y compararán sus resultados con los cultivos de control.

En un modelo murino (idsy/-) de MPSII (Síndrome de Hunter) que también se ha utilizado para evaluar los enfoques experimentales de terapia génica, el inicio del fenotipo morfológico bruto se manifiesta a los 3-4 meses de edad y se vuelve progresivamente más grave hasta muerte a la edad de 60 a 70 semanas. Este fenotipo incluye aumento de peso reducido, anomalías craneofaciales y otras anomalías esqueléticas, con un cráneo corto y alopecia y engrosamiento de los dedos. Adicionalmente, estos ratones muestran una marcha irregular, patrón de marcha anormal y habilidades locomotoras y exploratorias deficientes en la prueba de campo abierto. La actividad de IDS en este modelo de ratón es indetectable en hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, músculo esquelético, cerebro y ojo cuando se compara con las actividades de esta enzima en los tejidos de tipo salvaje. Sin embargo, IDS inicia el catabolismo de los GAG dermatán y heparán sulfato. La pérdida de la actividad de IDS provoca la acumulación de GAG en todos los tejidos después de solo varios días de vida, con un aumento drástico observado durante las etapas de la vida adulta; conduce a la vacuolización celular progresiva y la consiguiente muerte celular. Los ratones con MPSII a los 3 y 9 meses de edad muestran altos niveles de almacenamiento de GAG dentro de las células y, como se muestra en los ensayos radiográficos, la acumulación progresiva de GAG también causaba deformación

esquelética, lo que afectaba el rendimiento en las pruebas locomotoras. (Polito, VA et al., "Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery". Hum. Mol. Genet. 15(7): 1225-36, 1 de abril, 2006).

Los autores de la presente invención examinarán la actividad de IDS visualizando y cuantificando la acumulación de GAG en extractos de proteínas preparados a partir de productos homogeneizados de tejido de estos ratones con MPSII utilizando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil-α-iduronato-2-sulfato. Los GAG se pueden visualizar en los tejidos mediante tinción con azul alcián de las secciones incluidas en parafina de hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón y músculo esquelético en estos ratones. Además, las concentraciones de GAG se determinarán utilizando un ensayo de azul de dimetilmetileno con proteína.

Los autores de la presente invención administrarán a ratones idsy /- macho inyecciones i.v. o i.p. de una realización de formulación que comprende el péptido iduronato-2-sulfatasa conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano (o variante o porción del mismo) a una dosis por ratón de 1 µg a al menos 500 µg o más, si la solubilidad lo permite. Los autores de la presente invención evaluarán la acumulación de GAG (heparán sulfato y dermatán sulfato) utilizando técnicas de histopatología, y compararán estos resultados con los de un grupo de control.

En pacientes con síndrome de Hunter, los autores de la presente invención pretenden evaluar el efecto del tratamiento con realizaciones de formulación que comprenden la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-iduronato-2-sulfatasa sobre las manifestaciones sistémicas de la enfermedad, incluyendo las del SNC, en hueso, y en articulaciones, en relación con el desarrollo normal. Los pacientes con síndrome de Hunter serán tratados sistémicamente con una dosificación diaria crónica de las realizaciones de la formulación que comprenden, por ejemplo, enzima iduronato-2-sulfatasa conjugada con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o variante o porción de los mismos, o una realización de proteína de fusión o producto conjugado alternativa que comprende la secuencia de iduronato-2-sulfatasa y uno o más conectores a una dosis de menos de aproximadamente 0,01 mg/kg a menos de aproximadamente 100 mg/kg. La excreción de GAG en orina (heparán sulfato y dermatán sulfato) se evaluará mediante métodos conocidos, y los resultados se compararán con los de pacientes que recibieron una formulación que comprende la enzima iduronato-2-sulfatasa que no está en forma de proteína de fusión o producto conjugado. Adicionalmente, los autores de la presente invención evaluarán el desarrollo esquelético y cerebral evaluado mediante técnicas pediátricas de crecimiento y desarrollo convencionales.

Los autores de la presente invención evaluarán más a fondo la inmunogenicidad *in vitro* de las realizaciones de proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-iduronato-2-sulfatasa comparando las respuestas proliferativas en los grupos de tratamiento frente a los de control (placebo). Los cultivos de linfocitos se prepararán utilizando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con MPS II en los que se han documentado reacciones a la infusión mientras recibían terapia de reemplazo con enzima. Las respuestas proliferativas se determinarán midiendo la incorporación de 3H-timidina en estas células después de tres a cinco días de cultivo. En una realización, los autores de la presente invención compararán la inmunogenicidad del los productos conjugados o proteínas de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos (o variante o porción del mismo) que contienen el péptido de homeodominio humano-iduronato-2-sulfatasa con la inmunogenicidad de la enzima sola utilizando ensayos de proliferación de linfocitos en leucocitos mononucleares humanos aislados después de la incubación *in vitro* durante tres a cinco días a una concentración óptima por determinar, en el intervalo de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 115 µM. La inmunogenicidad de las realizaciones que comprenden los productos conjugados o proteínas de fusión de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos (o variantes o porciones de los mismos) se evaluarán examinando la incorporación de 3H-timidina por los linfocitos.

Las realizaciones alternativas que comprenden, por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugados con el péptido iduronato-2-sulfatasa incluyen una variedad de proteínas de fusión o productos conjugados, y pueden comprender uno o más conectores conocidos en la técnica, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida por la adición de uno o más conectores.

Ejemplo 4

Terapia de reemplazo de guanilil ciclasa de membrana retiniana (RetGC-1) en ceguera congénita

La Amaurosis congénita de Leber tipo 1 (LCA1): La RetGC-1 humana es una proteína de 1103 aminoácidos, que incluye los aminoácidos 52-1103 que codifican la enzima sola sin el péptido señal. La RetGC-1 es el producto génico de RPE65 que, cuando está ausente o mutado, causa ceguera. En esta enfermedad, la visión residual del fotorreceptor de cono se correlaciona con las propiedades bioquímicas de los mutantes, lo que implica que se puede lograr la restauración de la visión si se puede restaurar la actividad de la enzima RetGC-1 en la retina. Por lo tanto, las realizaciones y sus modificaciones descritas en la presente memoria incluyen proteínas de fusión o productos

conjugados que comprenden los péptidos de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos (o una variante o porción de los mismos) que pueden penetrar en las células y la enzima RetGC-1 como péptido de carga, y se pueden administrar en cualquier número de realizaciones de formulación para la inyección intraocular periódica o la administración tópica.

En una realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX C12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 1 (Tabla 3):
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX D12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 2 (Tabla 3):
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

y la segunda región conectada es, por ejemplo, una secuencia de la enzima RetGC-1 tal como:

SEQ ID NO: 33 (Tabla 3):
AVFTVGVLGPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRDPGLAGGPRFEVALLP
EPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLAEEAGIALVPWGCP
WTQAEGTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRSLSTA
LRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPRVTAVIMVMHSVLLGGEE
QRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAALANSSQLRRAHDA
VLTLTRHCPSEGSVLDSLRRAQERRELPSDLNLQQVSPLFGTIYDAVFLLAR
GVAEARAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDA
AGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPSCWFDPNNICGG
GLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGAFLAHYVRHRLLHMQMVSGPNKIILTVDDITF
LHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWL
KKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFLARGAEGPAALWEGN
LAVVSEHCTRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGIRYLHHRGVAHGR
LKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPA
LERRGTLAGDVFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQRVRSPPPLCRPL
VSMDQAPVECILLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLR
MLEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPE
YFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVETIGD
AYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIGLHS
GPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDS
GYQVELRGRTELKGKGAEDTFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQ
EIPPERRRKLEKARPGQFS.

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí. Y en otra realización con la adición de una metionina iniciadora, la secuencia peptídica completa de la proteína de fusión que incluye HOX C12 es, por ejemplo:

SEQ ID NO: 34 (Tabla 3):

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLAVFTVGVLGPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRDPGLAG
GPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLAEEA
GIALVPWGCPWTQAEGTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDL
WVEAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPRVTAVIM
VMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAALA
NSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDSLRRAQERRELPSDLNLQQVSPLF
GTIYDAVFLLARGVAEARAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGD
EEPPFVLLDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPS
CWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGAFLAHYVRHRLLHMQMVS
GPNKIILTVDDITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHLDSP
NIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFLAR
GAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGI
RYLHHRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLEAQKVLPEPPRAED
QLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVV
QRVRSPPPLCRPLVSMDQAPVECILLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFKNI
NKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSV
AEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAII
GSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRH
MPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIH
VNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKGKGAEDTFWLVGRRGFNKPIPKPP
DLQPGSSNHGISLQEIPPERRRKLEKARPGQFS

Y en otra realización más con la adición de una metionina iniciadora, la secuencia peptídica completa de la proteína de fusión que incluye HOX D12 es, por ejemplo:

SEQ ID NO: 35 (Tabla 3):

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVAVFTVGVLGPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRDPGLAGG
PRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLAEEAGI
ALVPWGCPWTQAEGTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWV
EAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPRVTAVIMVM
HSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAALANSS
QLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDSLRRAQERRELPSDLNLQQVSPLFGTIY
DAVFLLARGVAEARAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPP
FVLLDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPSCWF
DPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGAFLAHYVRHRLLHMQMVSGPNK
IILTVDDITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHLDSPNIGVY
EGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFLARGAEGP
AALWEGNLAVVSEHCTRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGIRYLHH
RGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLEAQKVLPEPPRAEDQLWTA
PELLRDPALERRGTLAGDVFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQRVRS
PPPLCRPLVSMDQAPVECILLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFKNINKGRK
TNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALK
TGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDV
YKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVP
VRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLST
VGILRALDSGYQVELRGRTELKGKGAEDTFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPG
SSNHGISLQEIPPERRRKLEKARPGQFS

Los conectores pueden no ser necesarios para la función, pero se pueden incluir conectores en una variedad de realizaciones, por ejemplo, entre SEQ ID NO: 1 y 33, o entre SEQ ID NO: 2 y 33, o variantes o porciones de los mismos, sin comprometer la función. Se puede utilizar cualquier conector conocido en la técnica, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida por su adición. Las realizaciones, por ejemplo, tales como SEQ ID NO: 34 y/o 35 o variantes o porciones de los mismos se alterarían, al menos en parte, en la medida en que la secuencia conectora uniera mediante puente estas primera y segunda regiones.

En otras realizaciones adicionales, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales a los extremos amino o carboxi para facilitar la purificación. Tales secuencias pueden incluir etiquetas FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 102), etiquetas myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 103), etiquetas His (HHHHHH) (SEQ ID NO: 80) y otras etiquetas similares conocidas por los expertos en la técnica. Tales etiquetas pueden o no incluir conectores. Además, se pueden utilizar ligandos tales como la proteína aceptora de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 105) junto con la proteína BirA activa. Para secuencias que incluyen una metionina iniciadora N-terminal, si se añade un dominio de purificación de N-terminal, la metionina estará en el extremo N-terminal del dominio de purificación en lugar de en el extremo N-terminal del homeodominio humano o la primera región del péptido HOX.

La translocación funcional satisfactoria de la enzima en células en las que la enzima generalmente es escasa o está ausente, por ejemplo, la translocación enzimática en las células HEK293 se puede determinar proporcionando el sustrato de la enzima y midiendo la actividad de la guanilil ciclasa por medio de métodos convencionales. La evidencia de una mayor actividad de la guanilil ciclasa se tomaría como evidencia experimental de que una realización tal como un homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano con capacidades de penetración en las células puede suministrar enzima funcional a las células humanas.

Los autores de la presente invención evaluarán realizaciones que comprenden, por ejemplo, una proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-enzima RetGC-1en un modelo de modificación genética para inactivar la expresión de un gen de ratón. El modelo animal que mejor se aproxima a LCA1 es la modificación genética para inactivar la expresión de Gucy2e, un gen que codifica RetGC-1. Este ratón muestra fotorreceptores de cono que no responden y demuestra el fenotipo LCA1. Jacobson et al.. "Determining consequences of retinal membrane guanylyl cyclase (RetGC1 deficiency in human Leber congenotal amaurosis en

route to therapy: residual cone-photoreceptor vision correlates with biochemical properties of the mutants." Human Molecular Genetics 22(1):168-83, 2013.

Los autores de la presente invención administrarán una realización de producto conjugado o proteína de fusión de de homeodominio humano-RetGC-1 mediante inyección retiniana (retrobulbar) o mediante gotas oculares (es decir, tópicamente) a los ratones con modificación genética para inactivar la expresión de un gen con evaluación de la función restaurada mediante electrorretinograma (ERG) como medida de visión devuelta. Los resultados se compararán con los de un grupo de control al que se administró un tampón sin el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-RetGC-1. En una realización, las proteínas se administrarán a ratones mediante inyección retiniana (retrobulbar) o mediante gotas oculares, de una formulación que comprende el péptido RetGC-1 conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o una variante o porción del mismo, o realizaciones de proteína de fusión o producto conjugado que contienen RetGC-1 alternativas que comprenden uno o más conectores a una dosis por 20 g de ratón de al menos aproximadamente 1 µg a al menos aproximadamente 500 µg. Los autores de la presente invención examinarán la restauración de la función mediante ERG en comparación con la de un grupo de control no tratado.

En niños con Amaurosis congénita de Leber tipo 1 (LCA1), los cambios en la agudeza visual y la función por medio de electrorretinograma se evaluarán después del tratamiento crónico (diario, cada dos días, dos veces por semana, semanalmente o menos frecuente) con una realización de formulación oftálmica que comprende el péptido RetGC- 1 conjugado con el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano o una variante o porción del mismo, o con realizaciones de proteína de fusión o producto conjugado alternativas que comprenden la secuencia RetGC-1 y uno o más conectores a una dosis de menos de aproximadamente 0,01 mg/kg a menos de aproximadamente 100 mg/kg. Después de varias duraciones de tratamiento, tales como 1 día, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas o más, los pacientes que recibieron el tratamiento con la proteína de fusión o el producto conjugado se compararán con sus valores de pretratamiento para evaluar las mejoras clínicamente significativas en la función visual utilizando métodos clínicos convencionales para evaluar la agudeza visual, incluyendo, entre otros, la función por medio de ERG.

Las realizaciones alternativas que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugados con el péptido RetGC-1 incluyen una variedad de proteínas de fusión o productos conjugados que comprenden uno cualquiera o más conectores conocidos en la técnica, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometido por la adición.

Ejemplo 5

Un péptido regulador para la Enfermedad de Huntington (HD)

La enfermedad de Huntington (HD), un trastorno genético neurodegenerativo que afecta a la coordinación muscular y conduce al deterioro cognitivo, está causada por la expresión de un gen de Huntingtina mutante (HTT). A menudo se manifiesta entre mediados de los años 30 y principios de los 40, pero puede comenzar antes, disminuyendo las capacidades físicas y mentales con el tiempo; el movimiento coordinado gradualmente se vuelve muy difícil. Clínicamente, también se observan varios defectos sutiles en pacientes con EH, incluidos problemas oculomotores, del habla y cognitivos. La expresión de HTT mutante es específica del cuerpo estriado, una parte del cerebro que controla los movimientos, y se cree que la pérdida y/o inflamación neuronal subyacen a los signos clínicos de la EH.

ZF6xHunt-Kox-1 es una proteína de dedo de cinc diseñada específicamente que une repeticiones CAG más largas y reprime la expresión del gen HTT mutante. También son posibles otras longitudes de proteínas de dedos de cinc, incluidas, pero no limitadas a, ZF12xHunt-Kox-1 y ZF18xHunt-Kox-1. Las realizaciones de la proteína de fusión o producto conjugado con el péptido que puede penetrar en las células de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano permitirán que ZF6xHunt-Kox-1, ZF12xHunt-Kox-1, ZF18xHunt-Kox-1 y proteínas relacionadas entren en las células y el núcleo para regular por disminución de manera efectiva y selectiva la expresión del gen HTT mutante. Los autores de la presente invención evaluarán el efecto de una variedad de realizaciones que comprenden las proteínas de fusión o productos conjugados de dedos de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos-dedo de cinc en la patología neurológica. Con este fin, los autores de la presente invención administrarán formulaciones intravenosas que comprenden las realizaciones de homeodominio humano-dedo de cinc a pacientes con enfermedad de Huntington. Específicamente, los autores de la presente invención evaluarán la capacidad del péptido de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano para atravesar la barrera hematoencefálica e ingresar al sistema nervioso central.

En una realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX C12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 1 (Tabla 3):

SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la secuencia de 60 aminoácidos del homeodominio HOX D12 humano de la primera región es:

SEQ ID NO: 2 (Tabla 3):
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

y la segunda región conectada es, por ejemplo, una secuencia ZF6xHunt-Kox-1;

SEQ ID NO: 36 (Tabla 3):
TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ
RHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
RATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICG
RKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVT
QGIIKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVM
LENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSS
V

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de la secuencia de carga mostrada aquí. Y, en otra realización con la adición de una metionina iniciadora, la secuencia peptídica completa de la proteína de fusión que incluye el péptido HOX C12 es, por ejemplo:

SEQ ID NO: 37 (Tabla 3):
MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICG
RKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFA
CDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG
EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVS
SLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDT
AQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHP
DSETAFEIKSSV

y en otra realización más con la adición de una metionina iniciadora, la secuencia peptídica completa de la proteína de fusión que incluye el péptido HOX D12 es, por ejemplo:

SEQ ID NO: 38 (Tabla 3):
MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC
DICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE
KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSS
LSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTA
QQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPD
SETAFEIKSSV

En una realización o realizaciones adicionales, se pueden incluir números adicionales de repeticiones de dedos de cinc como se muestra en estos ejemplos del segundo componente con 12 y 18 repeticiones respectivamente: ZF12xHunt-Kox-1, por ejemplo:

SEQ ID NO: 39 (Tabla 3):

TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ
RHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
RATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICG
RKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRI
CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSER
PFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ
RHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGM
DAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSL
GYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

ZF18xHunt-Kox-1, por ejemplo:

SEQ ID NO: 42 (Tabla 3):
TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ
RHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
RATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICG
RKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRI
CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSER
PFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ
RHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRICMRNFSQRA
TLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRN
FSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCR
ICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKD
GGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDAKSLTAWSRT
LVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVIL
RLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

En realizaciones adicionales, estas secuencias con números adicionales de repeticiones de dedos de cinc se muestran con el péptido de homeodominio humano incluido, por ejemplo, en una realización que comprende la secuencia con un residuo de metionina iniciadora:
HOX C12 humano-ZF12xHunt-Kox-1, por ejemplo:

SEQ ID NO: 40 (Tabla 3):

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICG
RKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFA
CDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG
EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVG
TAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQR
HTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQR
ATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVT
QGIIKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVM
LENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSS
V

HOX D12 humano-ZF12xHunt-Kox-1, por ejemplo:

SEQ ID NO: 41 (Tabla 3):
MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC
DICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE
KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGT
AERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRH
TKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRA
TLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK
FAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQ
GIIKNKEGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVML
ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

HOX C12 humano-ZF18xHunt-Kox-1, por ejemplo:

SEQ ID NO: 43 (Tabla 3):
MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQ
NRRMKKKRLLTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICG
RKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFA
CDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG
EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVG
TAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQR
HTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQR
ATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRIC
MRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPF
QCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTG
SERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRH
TKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDA
KSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGY
QLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

HOX D12 humano-ZF18xHunt-Kox-1, por ejemplo:

SEQ ID NO: 44 (Tabla 3):

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQN
RRMKKKRVVTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC
DICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE
KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGT
AERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRH
TKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRA
TLQRHTKIHTGSERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK
FAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVGTAERPFQCRIC
MRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSERPF
QCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTG
SERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRH
TKIHLRQKDGGGGSGGGGSGGGGSQLVSSLSPQHSAVTQGIIKNKEGMDA
KSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGY
QLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

En otras realizaciones, la segunda región puede ser una variación en cualquiera de las secuencias de carga mostradas anteriormente.

Los conectores pueden no ser necesarios para la función, pero se puede incluir conectores en una variedad de realizaciones, por ejemplo, entre SEQ ID NO: 1 y 36, 39 o 42 o entre SEQ ID NO: 2 y 36, 39 o 42 o una porción de los mismos sin comprometer la función. Se puede utilizar cualquier conector conocido en la técnica siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida por su adición; véase, p. ej., la Tabla 2. Las realizaciones tales como SEQ ID NO: 37, 38, 40, 41, 43 y/o 44 se alterarían, al menos en parte, en la medida en que la secuencia conectora uniera mediante puente estas primera y segunda regiones.

En otras realizaciones adicionales, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales a los extremos amino o carboxi para facilitar la purificación. Tales secuencias pueden incluir etiquetas FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 102), etiquetas myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 103), etiquetas His (HHHHHH) (SEQ ID NO: 80) y otras etiquetas similares conocidas por los expertos en la técnica. Además, se pueden utilizar ligandos tales como la proteína aceptora de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 105) junto con la proteína BirA activa. Para secuencias que incluyen una metionina iniciadora N-terminal, si se añade un dominio de purificación N-terminal, la metionina estará en el extremo N-terminal del dominio de purificación en lugar de en el extremo N-terminal de en la primera región del homeodominio humano o péptido HOX. Las realizaciones de la proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-dedo de cinc se someterán a prueba en una línea celular apropiada para determinar que las construcciones se translocan funcionalmente y que el gen HTT mutante es reprimido. Se utilizarán células STHdh modificadas genéticamente para activar la expresión de un gen, donde el primer exón del gen HTT de ratón ha sido reemplazado por un exón humano con 111 repeticiones CAG (STHdhQ111/HdhQ111 o STHdhQ7/HdhQ111).

En una realización, los autores de la presente invención examinarán la translocación de la proteína de carga de dedo de cinc utilizando la proteína de fusión o el producto conjugado que contiene el homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano de 60 aminoácidos (o variante o porción del mismo) presente después de la incubación de células STHdh modificadas genéticamente para activar la expresión de un gen en cultivo durante varios períodos de tiempo, tales como 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas o 24 horas a una concentración micromolar óptima a determinar, probablemente entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 115 µM. Los autores de la presente invención evaluarán la expresión del gen HTT mutante por métodos conocidos y compararán los resultados con los de los cultivos de control.

Los ratones R6/2 son el modelo animal de HD más ampliamente utilizado. Este modelo de ratón para HD con modificación genética para activar la expresión de un gen expresa en exceso el gen HTT humano en el cerebro en una ubicación que se sabe que afecta a pacientes humanos, el cuerpo estriado. Los ratones R6/2 demuestran fenotípicamente déficits motores análogos a los signos y síntomas en pacientes con EH, por ejemplo, los ratones R6/2 carecen de la capacidad de agarrarse con sus garras frontales.

En una realización, comenzando a las tres o cuatro semanas de edad los autores de la presente invención evaluarán las habilidades motoras en ratones R6/2; la mitad serán tratados y los otras servirán como grupo de control. Los autores de la presente invención administrarán a los ratones a través de inyecciones i.v. o i.p. una formulación diaria, cada dos días o cada tres días, una realización de proteína de fusión o producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-dedo de cinc que comprende, por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 37, 38, 40, 41, 42, o 43 o cualquier porción de los mismos, durante una o dos semanas. A las cuatro o seis semanas de edad, los autores de la presente invención volverán a evaluar las habilidades motoras justo antes del sacrificio para el análisis histológico. El análisis histológico será en dos partes. En primer lugar, utilizando rtPCR, se evaluará la expresión de HTT mutante en cada cuerpo estriado de los grupos de ratones tratados y de control. En segundo lugar, se evaluará la evidencia de pérdida neuronal del estriado en los cuerpos estriados de los ratones tratados frente a los de control no tratados. La reducción en la pérdida neuronal y/o el volumen de las células estriatales se evaluará utilizando mecanismos bien conocidas en los laboratorios de neurohistología, y se referirán como densidad de neuronas por campo de microscopio convencional con un aumento común. Por lo tanto, los autores de la presente invención evaluarán tanto la expresión del gen HTT mutante como la evidencia de pérdida neuronal en el cuerpo estriado del cerebro mediante métodos conocidos, y después de evaluar los déficits motores, compararán los resultados de los ratones R6/2 tratados con los de los ratones R6/2 de control no tratados; los autores de la presente invención compararán adicionalmente la puntuación de déficits motores después del tratamiento de cada grupo con su propia puntuación en el momento inicial.

En pruebas clínicas con pacientes con enfermedad de Huntington, los déficits motores se evaluarán mediante el uso de la Puntuación Motora Total de la Escala Unificada de Valoración de la Enfermedad de Huntington (UHDRS), una herramienta clínica utilizada para evaluar pacientes en pruebas de terapia de HD. Proporciona una evaluación cuantitativa de los beneficios del tratamiento en HD, proporcionando una puntuación compuesta basada en una serie de déficits motores. Autores del grupo de estudio Huntington, "Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and Consistency" Movement Disorders 11(2):136-142, 1996. Un cambio de la puntuación motora total antes o después del tratamiento de un punto o más se considera clínicamente significativo.

Los autores de la presente invención evaluarán la progresión de la enfermedad como se refleja en el cambio en las habilidades motoras en pacientes con EH después de la administración de una realización de formulación que comprende una proteína de fusión o un producto conjugado de homeodominio HOX C12 u HOX D12 humano-dedo de cinc. Por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 37, 38, 40, 41, 42 o 43, o una porción de los mismos. Primero los autores de la presente invención evaluarán las puntuaciones UHDRS en este grupo de tratamiento de estos pacientes y a continuación, en el transcurso de seis a ocho semanas, los autores de la presente invención administrarán la realización de la formulación de proteína de fusión o producto conjugado por inyección intravenosa o subcutánea diariamente a una dosis óptima por determinar, que varía de al menos 0,01 mg/kg a al menos aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. La función motora y otros déficits puntuados en HD se evaluarán después del tratamiento basándose en la Escala de Unificada de Valoración de la Enfermedad de Huntington (UHDRS) Puntuación Motora Total; los resultados se compararán con la puntuación en el momento inicial. Los autores de la presente invención evaluarán el porcentaje de mejora en UHDRS en relación con los controles no tratados o los controles históricos seguidos durante el mismo período.

Las realizaciones alternativas que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19, o variantes o porciones de los mismos, conjugadas con cualquiera de los péptidos de dedo de cinc discutidos anteriormente incluyen una variedad de proteínas de fusión o productos conjugados que comprenden uno o más conectores conocidos en la técnica, siempre que la función del producto conjugado no se vea comprometida con la adición.

Ejemplo 6

Péptidos que pueden penetrar en las células y aplicaciones de vacunas. Se ha demostrado que los péptidos que pueden penetrar en las células facilitan el suministro de epítopos antigénicos al citoplasma de las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas, lo que permite el procesamiento y la presentación del antígeno de una manera dependiente del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II a células T CD8 y CD4 respectivamente y provocan una respuesta inmunitaria eficaz (Brooks, et al. Cell-penetrating peptides: Application in vaccine delivery, Biochimica et Biophysica Acta 1805:25-34, 2010). Se ha demostrado que los CPP que utilizan un conector sensible a la furina para la conjugación con epítopos antigénicos son eficaces para provocar respuestas de células T CD8 citolíticas específicas de antígeno cuando se administran con oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG (Lu et al. TAP-independent presentation of CTL epitopes by Trojan antigens, J. Immunol. 166:7063-7071, 2001). Otros métodos de conjugación que permiten la liberación de la carga antigénica en las células presentadoras de antígeno incluyen el uso de un enlace disulfuro que es escindido por el glutatión citoplasmático (Kim et al. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide, J. Immunol. 159:1666-68, 1997) y el uso de péptidos antigénicos tratados con 4-maleimidometilciclohexano carboxilato de sulfosuccinimidilo (SMCC) seguido de reacción con un CPP modificado con cisteína C-terminal (Apostolopoulos et al. Delivery of tumor associated antigens to antigen presenting cells using penetratin induces potent immune responses, Vaccine 24:3191-202, 2006). Las proteínas de fusión de CPP sin

conectores también se han utilizado satisfactoriamente para generar respuestas de células T específicas a antígenos tumorales (Batchu et al. Protein transduction of dendritic cells for NY-ESO-1-based immunotherapy of myeloma, Cancer Res. 65:10041-49, 2005, Scheller et.al. Human cytomegalovirus protein pp65: an efficient protein carrier system into human dendritic cells, Gene Ther. 15:318-325, 2008, Viehl et.al. Tat mammaglobin fusion protein transduced dendritic cells stimulate mammaglobin-specific CD4 and CD8 T cells, Breast Cancer Res. Treat.91:271-78, 2005).

Tradicionalmente, las vacunas se han basado en coadyuvantes que a menudo son ligandos para receptores tipo toll (TLR) para dirigir antígenos a las células dendríticas para mejorar las respuestas inmunitarias. Este enfoque no ha funcionado bien en el caso de las vacunas para prevenir o mejorar los resultados en la tuberculosis. Quizás una razón es una inhibición dependiente de TLR2 de la presentación de antígenos dependiente de MHC clase II que también se ha informado que es un mecanismo importante que permite la infección persistente de micobacterias en macrófagos (Harding, C.V y Boom, W.H., Regulation of antigen presentation by Mycobacterim tuberculosis: a roll for Toll-like receptors. Nat Rev Microbiol. 8(4):296-307, 2010). Por lo tanto, el uso de CPP puede promover el procesamiento y la presentación eficaces del antígeno a células dendríticas y evitar este efecto indeseable de los agonistas de TLR2, mientras que muchos de los candidatos actuales a la vacuna contra la tuberculosis, tales como los que dependen de vectores de adenovirus (Appledorn et al. Adenovirus Vector-Induced Innate Inflammatory Mediators, MAPK Signaling, As Well As Adaptive Immune Responses Are Dependent upon Both TLR2 and TLR9 In Vivo. J Immunol 181:2134-44, 2008) y los coadyuvantes no lo hacen (Frick, M. The Tuberculosis Vaccines Pipeline, junio de 2013 http://www.pipelinereport.org/2013/tb-vaccine y Rowland, R. y McShane. Expert Rev Vaccines 10(5): 645-58, 2011).

En una realización de vacuna, el producto conjugado comprende una primera región, el homeodominio humano o variante o porción del mismo que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 1 o 2 conjugada con una segunda región no asociada naturalmente con la primera región, en donde la segunda región es un antígeno peptídico o una porción del antígeno que es un epítopo antigénico. En una variedad de realizaciones, la conjugación puede ser como en forma de una proteína de fusión (enlace peptídico) o puede utilizar un conector como el conector sensible a la furina (RVKR) (SEQ ID NO: 117), un enlace disulfuro u otros tipos de proteínas para la conjugación de proteínas conocidas en la técnica.

Antígeno 85A de vacuna contra la tuberculosis y sus epítopos. El complejo antigénico 85 es una familia multigénica que codifica varias proteínas secretadas principales estrechamente relacionadas en las micobacterias. El péptido señal se escinde en proteínas Ag85 maduras. Ag85A es un péptido de 338 aminoácidos con una masa molecular de 35,7 kDa y un pl pronosticado de 6,5. También se le llama antígeno α extracelular y tiene una actividad micoliltransferasa importante en la síntesis de la pared celular. El análisis de la inmunogenicidad y actividad protectora de epítopos peptídicos más pequeños en ratones Balb/c (Tchilian et. al. Immunization with different formulations of Mycobacterium tuberculosis antigen 85A induces immune responses with different specificity and protective efficacy. Vaccine 31:4624-31, 2013) después de la inmunización intranasal y sistémica de ratones utilizando un vector adenoviral recombinante, Ag85A recombinante en sí o como un conjunto de péptidos de 15 unidades solapantes (epítopos restringidos Balb/c H-2D únicos) demostró una protección superior contra la sensibilización con Mycobacterium tuberculosis (Mtb) después de la inmunización intranasal. Las respuestas CD4 85A99-118 y CD8 85A70-78 fueron protectoras mientras que la respuesta a CD8 85A145-152 no fue protectora.

Las pruebas de vacunas en seres humanos con la vacuna de adenovirus Ag85A para mejorar la eficacia de la vacuna BCG en lactantes indujeron solo respuestas inmunitarias moderadas y no tuvieron ninguna eficacia clínica (Tameris et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. The Lancet 381:1021-1028, 2013). Esto podría deberse a los efectos inhibidores de las propiedades agonistas de TLR2 del componente de adenovirus que se demuestra que provoca respuestas de IL-10 que regulan por disminución la respuesta inmunitaria o debido a respuestas no protectoras a algunos epítopos de Ag85A.

Vacuna contra la tuberculosis. Las realizaciones actuales para una vacuna protectora contra la tuberculosis humana son productos conjugados o una mezcla de productos conjugados administrados por vía inhalada, intranasal o inyectable parenteral. La ruta inhalada puede proporcionar inmunidad local en el pulmón.

En ratones Balb/c, el concepto se someterá a prueba cuando un producto conjugado o una mezcla de producto conjugado esté compuesto por una primera región, el homeodominio humano de SEQ ID NO: 1 o 2 conjugado con una segunda región no asociada naturalmente con la primera región. En ciertas realizaciones, la segunda región es uno o más de cuatro péptidos que abarcan el epítopo Ag85A 99-118 (véase la Tabla 3):

El péptido uno de cuatro del epítopo Ag85A 99-118 es SEQ ID NO: 51: ETFLTSELPGWLQAN;
El péptido dos de cuatro del epítopo Ag85A 99-118 es SEQ ID NO: 54: SELPGWLQANRHVKP;
El péptido tres de cuatro del epítopo Ag85A 99-118 es SEQ ID NO: 57: WLQANRHVKPTGSAV; y
El péptido cuatro de cuatro del epítopo Ag85A 99-118 es SEQ ID NO: 60: RHVKPTGSAVVGLSM.

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de uno o más de estos cuatro péptidos. Los números de ID de secuencia para varios de estos productos conjugados se muestran en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, la secuencia de aminoácidos completa de la primera (HOQ C12) (SEQ ID NO: 1) y la segunda región SEQ ID NO: 51 del epítopo Ag85A 99-118 combinadas es SEQ ID NO: 52:
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNRRM KKKRLLETFLTSELPGWLQAN.
Del mismo modo, en otra realización, la secuencia de aminoácidos completa de la primera (D12 HOX) (SEQ ID NO: 2) y la segunda región de SEQ ID NO: 51 del epítopo Ag85A 99-118 combinadas es SEQ ID NO: 53:
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRRM KKKRVVETFLTSELPGWLQAN .

El segundo producto conjugado o mezcla de productos conjugados para la prueba en ratones Balb/c están compuestos por una primera región, el homeodominio humano de SEQ ID NO: 1 o 2 conjugado con una segunda región no asociada naturalmente con la primera región. En ciertas realizaciones, la segunda región es uno o más de tres péptidos que abarcan el epítopo Ag85A 70-78 (véase la Tabla 3):

El péptido uno de los tres del epítopo Ag85A 70-78 es SEQ ID NO: 63: QSGLSVVMPVGGQSS;

El péptido dos de tres del epítopo Ag85A 70-78 es SEQ ID NO: 66: VVMPVGGQSSFYSDW; y

El péptido tres de tres del epítopo Ag85A 70-78 es SEQ ID NO: 69: GGQSSFYSDWYQPAC.

En otras realizaciones más, la segunda región es una variación de uno o más de estos tres péptidos. Los números de ID de secuencia para varios de estos productos conjugados también se muestran en la Tabla 3. Por ejemplo, en una realización, la secuencia de aminoácidos completa de la primera (HOX C12) (SEQ ID NO: 1) y la segunda regiones SEQ ID NO: 63 del epítopo Ag85A 70-78 combinadas es SEQ ID NO: 64:
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNRRM KKKRLLQSGLSVVMPVGGQSS.
Del mismo modo, en otra realización, la secuencia de aminoácidos completa de la primera (HOX D12) (SEQ ID NO: 2) y la segunda región SEQ ID NO: 63 del epítopo Ag85A 70-78 combinadas es SEQ ID NO: 65:
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQSVQQVSQSVGSQSVS.

Por lo tanto, la vacuna completa que se someterá a prueba en ratones y más tarde en seres humanos está compuesta de mezclas de productos conjugados donde cada producto conjugado tiene, como carga en una variedad de realizaciones, uno o más de estos péptidos más pequeños o variaciones de los mismos, y juntos proporcionan una respuesta CD4 robusta a Ag85A 99-118 y una respuesta CD8 robusta a Ag85A 70-78.

En una realización de vacuna humana, la vacuna estará compuesta por una primera región, el homeodominio humano de SEQ ID NO: 1 o 2 conjugada con una segunda región no asociada naturalmente con la primera región, en donde la segunda región es, en una realización, el péptido de 338 aminoácidos Ag85A completo o un epítopo de Ag85A restringido por HLA, tal como uno o más epítopos específicos de Ag85A restringidos por HLA que se ha demostrado que provocan respuestas inmunitarias en sujetos humanos apropiados (véase la Tabla 3). El péptido Ag85A, o sus epítopos humanos, pueden estar conectados a la primera región como se describió anteriormente. En otra realización, la secuencia completa de Ag85A está conectada a la primera región para proporcionar una construcción de vacuna única para sujetos con diferentes genotipos de HLA de clase I y clase II. La secuencia Ag85A es:

MQLVDRVRGA VTGMSRRLVV GAVGAALVSG LVGAVGGTAT AGAFSRPGLP

VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA
FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG
WLQANRHVKP TGSAVVGL***S***M AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ
AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV
WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FL***E***GFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVFDFP
DSGT***H***SWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA: (SEQ ID NO: 106)

Aquí, la región más larga de la secuencia en negrita y subrayada anterior es el péptido señal que se escinde cuando se produce la secuencia de Ag85A madura (el péptido de 296 aminoácidos restante). El dominio de unión a fibronectina se muestra en negrita y cursiva justo debajo de él, y los tres aminoácidos debajo de eso en negrita, subrayados y en cursiva se encuentra el dominio catalítico.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de la segunda región para Ag85A (sin el péptido señal) sería:
AFSRPGLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS

VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSAVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVFDFP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA. El número de ID de secuencia (SEQ ID NO: 72) para este péptido de carga Ag85A se muestra en la Tabla 3, junto con dos de muchas posibles realizaciones en las que el péptido de carga Ag85A o una variación comprenden la segunda región del producto conjugado o proteína de fusión: aquellos que contienen las secuencias de la primera región HOX C12 (SEQ ID NO: 73) u HOX D12 (SEQ ID NO: 74). Un experto en la técnica de la biología molecular/biotecnología apreciaría que numerosas variaciones en cualquiera de estas y otras secuencias mostradas en la Tabla 3 caerían dentro de las realizaciones descritas en la presente memoria.

Medición de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna. Los cultivos de sangre completa in vitro con antígenos específicos y la medición de las respuestas de citocinas tipo I se utilizaron satisfactoriamente para medir la respuesta inmunitaria a la vacuna de Ag85A de vector de adenovirus en una prueba clínica de fase I (Smaill et al. A Human Type 5 Adenovirus-Based Tuberculosis Vaccine Induces Robust T Cell Responses in Humans Despite Preexisting Anti-Adenovirus Immunity. Sci. Transl. Med. 5, 205: 1-11, 2013). Esta técnica se puede utilizar para medir la respuesta inmunitaria en humanos a las mezclas de vacunas de epítopos Ag85A basadas en CPP. En modelos murinos, se pueden utilizar métodos similares con cultivos de linfocitos esplénicos posteriores al tratamiento y medición de respuestas de citocinas en ratones Balb/c utilizando los epítopos descritos.

El número de células T CD4 sensibles a epítopos antigénicos específicos se puede cuantificar mediante ensayos ELISPOT de IFN-gamma y las respuestas de las células T CD4 y CD8 se pueden medir mediante tinción de citocinas intracelulares junto con la clasificación del subtipo de células T en cultivos de linfocitos de sangre periférica (Smaill et al. 2013).

Ejemplo 7

Las estructuras de CPP derivados de seres humanos incluyen la primera región, que comprende el homeodominio HOX D12 (SEQ ID NO: 2) o el homeodominio HOX C12 (SEQ ID NO: 1). La primera región se puede conjugar con una segunda región de modo que la primera región se pueda utilizar para transportar 'carga' a dianas intracelulares y/o intranucleares que se pueden expresar anormalmente en estados de enfermedad. Tales dianas pueden incluir estructuras de ácido nucleico tales como genes, ARNm y miARN. Aquí se pueden diseñar ADN, ARN, LNA, PNA, γPNA, otro ácido nucleico convencional o modificado o una combinación de estos componentes para la unión a estas dianas intracelulares y/o intranucleares y la reducción de la expresión anormal o la característica de activación del estado de la enfermedad. La Tabla 4 muestra secuencias de nucleótidos, y tres ejemplos se describen a continuación.

Tabla 4: Identidades de secuencia de nucleótidos

SEQ ID NO:	Descriptor	Secuencia de nucleótidos
75	Secuencia diana de miARN132 a la que se une la carga	5'-UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG-3'
76	Secuencia de carga que se une a miARN21	5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'
77	Secuencia diana de miARN21 a la que se une la carga	5'- TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'
78	Secuencia de carga que se une a miARN132	5'-CGACCATGGCTGTAGACTGTTA-3'
79	Secuencia de carga que se une a DYRK1b	5'-GTGGTGAAAGCCTATGATCAT-3'

Afectación de la ruta Ras: En una o más realizaciones, una carga de la segunda región se une a una secuencia diana de miARN132 para afectar a la ruta Ras.

La ruta Ras se expresa anormalmente en muchos tipos de cáncer y las construcciones que afectaran a la ruta reducirían el crecimiento de los tumores dependientes de ella. Las pruebas de diagnóstico identificarían a aquellos pacientes cuyos tumores tendrían más probabilidades de responder a este tratamiento. Se pueden utilizar líneas celulares tumorales que se sabe que tienen la ruta Ras activada para demostrar la actividad biológica de las construcciones inhibidoras de Ras descritas a continuación. Reducirán el crecimiento de estas células tumorales in vitro y reducirán el crecimiento de los tumores en modelos de xenoinjerto murino que utilizan estas células después del tratamiento sistémico.

En una realización, la primera región de la secuencia de aminoácidos de HOX C12 es SEQ ID NO: 1:

SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRLL

En otra realización, la primera región de la secuencia de aminoácidos HOX D12 es SEQ ID NO: 2:
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNR
RMKKKRVV

En otra realización, la carga de la segunda región puede ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 76 del ácido nucleico (Tabla 4) (o una variación del mismo):

5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'. En otra realización más, por ejemplo, el producto conjugado completo comprende SEQ ID NO: 1 y 76.

Afectación de las rutas supresoras de tumores en muchos tipos de cáncer: La carga de la segunda región se une a la secuencia diana de miARN21 para afectar a las rutas supresoras de tumores que se encuentran en muchos tipos de cánceres. Como en el ejemplo de la ruta Ras descrito anteriormente, en una variedad de realizaciones la secuencia de homeodominio de la primera región puede ser HOX C12 (SEQ ID NO: 1) u HOX D12 (SEQ ID NO: 2) (véase la Tabla 3). En una o más realizaciones, la carga de la segunda región del producto conjugado se une a una secuencia diana de miARN21, cuya secuencia incluye, pero no se limita a SEQ ID NO: 77 (Tabla 4), o cualquier variación del mismo. Por lo tanto, en una realización, la carga de la segunda región, por ejemplo, 5'-CGACCATGGCTGTAGACTGTTA-3' (SEQ ID NO: 78), se une a la secuencia diana miARN21, por ejemplo, 5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3' (SEQ ID NO: 77) para afectar a las rutas supresoras de tumores que se encuentran en muchos tipos de cánceres.

Las pruebas de estas construcciones in vitro y en modelos de tumor de xenoinjerto murino pueden confirmar su actividad midiendo la reducción del crecimiento de las células tumorales y del crecimiento tumoral. El tratamiento de pacientes con cáncer que tienen tumores que tienen una expresión anormal de este miARN tendrá un beneficio clínico. En una realización, la secuencia de carga de la segunda región (SEQ ID NO: 79) se une a la secuencia diana DYRK1b. En otras realizaciones, las variaciones de SEQ ID NO: 79 se unen a DYRK1b, o una variación funcional del mismo.

Afectación de la expresión génica: En una o más realizaciones, la carga de la segunda región se une a DYRK1b para reducir la expresión génica.

La expresión en exceso de este gen está presente en muchos cánceres, incluidos los cánceres de pulmón y de páncreas. Las mutaciones en DYRK1b que dan como resultado un aumento de la expresión también se asocian con la herencia familiar de diabetes tipo II, obesidad central y enfermedad arterial coronaria temprana, todas características del síndrome metabólico. Es probable que esta ruta también esté contribuyendo a la patogénesis de la diabetes tipo II y la obesidad en la población general. Por lo tanto, el tratamiento sistémico con inhibidores de DYRK1b tales como los que se describen a continuación tendrá eficacia en los cánceres con una expresión anormalmente alta de DYRK1b y también en pacientes con diabetes tipo II y otras características del síndrome metabólico. Será especialmente eficaz en aquellos pacientes con mutaciones identificadas en DYRK1b que conducen a una expresión en exceso. Como en los ejemplos de rutas supresoras de tumores y Ras discutidas anteriormente, una variedad de realizaciones de la secuencia de homeodominio de la primera región puede ser, por ejemplo, HOX C12 (SEQ ID NO: 1) u HOX D12 (SEQ ID NO: 2) (véase la Tabla 3). En una realización, la secuencia 5'-GTGGTGAAAGCCTATGATCAT-3' (SEQ ID NO: 79, véase la Tabla 4) o una variación de la misma, se une a DYRK1b. En otras realizaciones, las variaciones de SEQ ID NO: 79 se unen a DYRK1b, o una variación funcional del mismo.

Para ciertas comparaciones entre grupos referidos en los estudios descritos en los ejemplos anteriores, se sometió a prueba significación a $p < 005$.

A partir de lo anterior, se apreciará que se han descrito realizaciones específicas en la presente memoria con fines ilustrativos, pero que se pueden realizar diversas modificaciones sin desviarse del alcance de la descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un producto conjugado que comprende:

una primera región que comprende una estructura de homeodominio humano y que tiene una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 1 o 2; y
una segunda región que comprende un polipéptido o proteína funcionales o reguladores o una molécula pequeña farmacológicamente activa no asociada naturalmente con la primera región.

2. Un producto conjugado de la reivindicación 1, en donde la segunda región incluye al menos uno de un dominio de unión a NEMO, una proteína de fusión derivada de PC1 CTT, una enzima que restaura la función enzimática en sujetos con deficiencias enzimáticas heredadas, un producto génico de RPE65, un péptido de dedo de cinc, un péptido Ag85A, un péptido epitópico 99-118 de Ag85A, o un péptido epitópico 70-78 de Ag85A.

3. El producto conjugado de la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a NEMO tiene una secuencia de polipéptidos mostrada en SEQ ID NO: 20 o una variante del mismo.

4. El producto conjugado de la reivindicación 2, en donde la proteína de fusión derivada de PC1 CTT tiene una secuencia de polipéptidos mostrada en al menos uno de SEQ ID NO: 23 o 26 o una variante de los mismos; la enzima que restaura la función enzimática en sujetos con deficiencias enzimáticas heredadas tiene una secuencia de polipéptidos de al menos uno de SEQ ID NO: 30, 45 o 48 o una variante de los mismos; el producto génico de RPE65 tiene una secuencia de polipéptidos que incluye al menos SEQ ID NO: 33 o una variante del mismo; la secuencia peptídica de dedo de cinc incluye al menos uno de SEQ ID NO: 36, 29 o 42 o una variante de los mismos; el péptido Ag85A tiene SEQ ID NO: 72 o una variante del mismo; el péptido epitópico 99-118 de Ag85A tiene una secuencia que incluye al menos uno de SEQ ID NO: 51, 54, 57 o 60 o una variante de los mismos; o el péptido epitópico 70-78 de Ag85A tiene una secuencia que incluye al menos uno de SEQ ID NO: 63, 66 o 69 o una variante de los mismos.

5. El producto conjugado de la reivindicación 1, en donde la segunda región está conjugada con el extremo C de la primera región o con el extremo N de la primera región.

6. El producto conjugado de la reivindicación 1 en forma de una proteína de fusión.

7. El producto conjugado de la reivindicación 1, en donde la segunda región interactúa con una diana intracelular y/o una diana intranuclear.

8. El producto conjugado de la reivindicación 7, en donde la interacción de la segunda región con la diana intracelular y/o la diana intranuclear afecta a uno o más de los siguientes: activación de NF-κB, uveítis, actividad del factor de transcripción PC1 en células tubulares renales con mutaciones de la enfermedad renal poliquística, sustrato de glucocerebrosidasa en células con mutaciones de GCasa de la enfermedad de Gaucher, glicosaminoglicanos en sujetos con síndrome de Hurler o síndrome de Hunter, sustrato de guanilil ciclasa de membrana retiniana en células retinianas con deficiencia de guanilil ciclasa de la membrana retiniana, regulación de la transcripción del gen mutante Huntingtina en células con mutaciones de la enfermedad de Huntington, y suministro de epítopos antigénicos al citoplasma de las células presentadoras de antígeno para provocar una respuesta inmunitaria eficaz en una realización de vacuna, tal como una vacuna contra la tuberculosis para prevenir la tuberculosis en sujetos expuestos a la infección.

9. El producto conjugado de la reivindicación 1, en donde la segunda región tiene una secuencia de polipéptidos que incluye SEQ ID NO: 23 o 26 o una variante de los mismos, y en donde el producto conjugado comprende adicionalmente un antagonista del receptor V2 no competitivo.

10. El producto conjugado de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una secuencia conectora entre la primera y segunda regiones.

11. El producto conjugado de la reivindicación 1, en donde la primera y segunda regiones combinadas tienen una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 22, 24, 25, 27, 28, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 49 y 50, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 73 y 74, o una variante de los mismos.

12. El producto conjugado de la reivindicación 11, en donde un residuo de metionina iniciador de la secuencia se elimina antes de su uso como agente activo y/o terapéutico.

13. El producto conjugado de la reivindicación 1, en donde la primera y segunda regiones combinadas tienen una secuencia que comprende una estructura de homeodominio humano y al menos uno de un dominio de unión a

NEMO, una proteína de fusión derivada de PC1 CTT, una enzima que restaura la función enzimática en sujetos con deficiencias enzimáticas heredadas, un producto génico de RPE65, un péptido de dedo de cinc, un péptido epitópico 99-118 de Ag85A y un péptido epitópico 70-78 de Ag85A.

14. El producto conjugado de la reivindicación 13, en donde la segunda región interactúa con una diana intracelular y/o una diana intranuclear.

15. El producto conjugado de la reivindicación 14, en donde la interacción de la segunda región con una diana intracelular y/o una diana intranuclear afecta a uno o más de los siguientes: activación de NF-κB, uveítis, actividad del factor de transcripción PC1 en células tubulares renales con mutaciones de la enfermedad renal poliquística, sustrato de glucocerebrosidasa en células con mutaciones de GCasa de la enfermedad de Gaucher, glicosaminoglicanos en sujetos con síndrome de Hurler o síndrome de Hunter, sustrato de guanilil ciclasa de membrana retiniana en células retinianas con deficiencia de guanilil ciclasa de membrana retiniana, regulación de la transcripción del gen mutante Huntingtina en células con mutaciones de la enfermedad de Huntington, y suministro de epítopos antigénicos al citoplasma de las células presentadoras de antígeno para provocar una respuesta inmunitaria eficaz como componente activo de las vacunas, como por ejemplo en una vacuna contra la tuberculosis para prevenir la tuberculosis en sujetos expuestos a la infección.

16. Una composición que comprende el producto conjugado de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

17. La composición de la reivindicación 16, en donde la composición está en forma de una composición inhalable, una formulación de gotas para los ojos, otra composición oftálmica para uso local o inyectable, un enema, una composición tópica o una composición inyectable incluyendo implantes inyectables para liberación sostenida.

18. El producto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la composición de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento de afecciones de ojo seco u otras afecciones oculares inflamatorias.

19. Un producto conjugado que comprende:

una primera región que comprende una estructura de homeodominio humano que tiene una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 1 o 2; y
una segunda región que comprende un ácido nucleico funcional o regulador o ácido péptidonucleico no asociado naturalmente con la primera región.

20. El producto conjugado de la reivindicación 19, en donde la segunda región comprende ADN, ARN, LNA, PNA, γPNA, o una combinación de estos componentes que tiene actividad biológica intracelular.

21. El producto conjugado de la reivindicación 19, en donde la segunda región incluye un ácido nucleico que se une a miARN21 o a DYRK1b y/o regula su expresión; tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en al menos uno de SEQ ID NO: 76, 78 o 79 o una variante de los mismos; está conjugado con el extremo C-terminal de la primera región; está conjugado con el extremo N-terminal de la primera región; está conjugado con la primera región mediante un enlace peptídico; está conjugado a la primera región a través de un enlace no peptídico; o cualquier combinación de los mismos.

22. El producto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde la segunda región está conjugada al extremo C-terminal de la primera región, conjugada al extremo N-terminal de la primera región, conjugada a la primera región con un enlace peptídico, conjugada a la primera región a través de un enlace no peptídico.

23. El producto conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde la segunda región se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico o PNA que se une a miARN132 para afectar a la ruta Ras, una secuencia de ácido nucleico o PNA que hibrida de manera estable con una secuencia de nucleótidos de miARN como se expone en SEQ ID NO: 75 o una variante del mismo, una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO: 78 o una porción de dicha secuencia de nucleótidos o una variante de la misma que hibrida de manera estable con miARN132, una secuencia de ácido nucleico o PNA que se une a miARN21 para afectar a una ruta supresora de tumores o al crecimiento tumoral, una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO: 76 o una variante del mismo o puede hibridar de manera estable con una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO: 77 o una variante del mismo.

24. El producto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde la estructura de homeodominio de la primera región tiene una secuencia de polipéptidos como se expone en SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma.

25. El producto conjugado de la reivindicación 24, en donde la segunda región se une a DYRK1b.

26. El producto conjugado de la reivindicación 25, en el que la segunda región tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO: 79 o una variante del mismo.

27. El producto conjugado de la reivindicación 19, en donde la primera región y la segunda región están ancladas a través de "química clic" o mediante un enlace peptídico.

28. El producto conjugado de la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento del cáncer.

29. El producto conjugado de la reivindicación 25 o la reivindicación 26, para su uso en el tratamiento del cáncer.

30. El producto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la composición de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento del cáncer.

31. El producto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la composición de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, para su uso como vacuna.

32. El producto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la composición de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central.

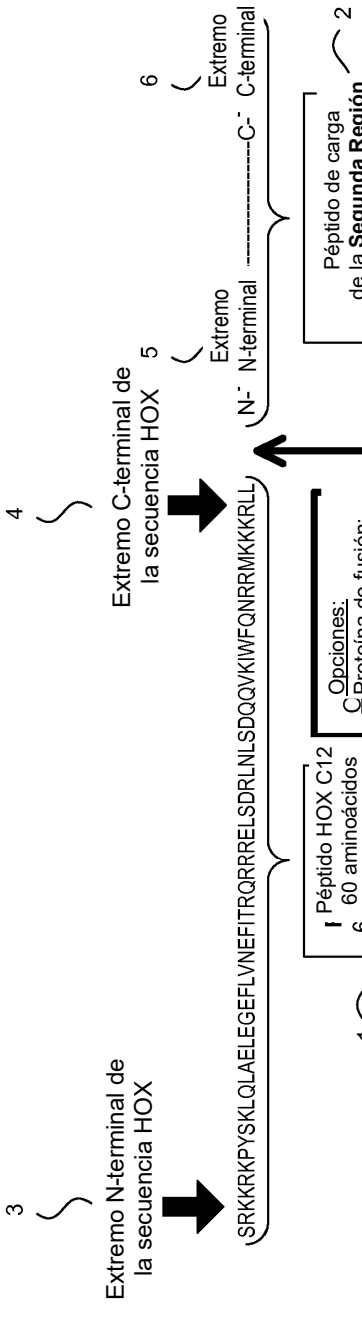
3
Extremo N-terminal de la secuencia HOX
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRLL
4
Extremo C-terminal de la secuencia HOX
1
Péptido HOX C12 60 aminoácidos de la Primera Región
12
Opciones:
C Proteína de fusión:
F sin conector
n (enlace peptídico solo)
(f
C conector
13
Producto conjugado:
5
Extremo N-terminal
N-
6
Extremo C-terminal
-C-
2
Péptido de carga de la Segunda Región

FIG. 1

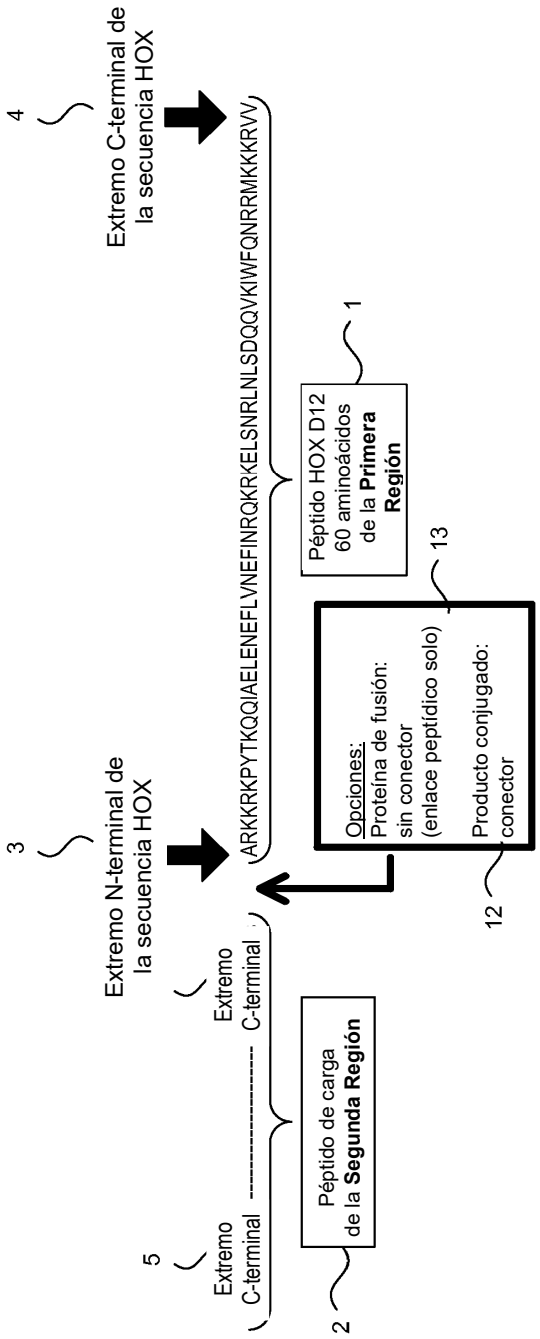
4
Extremo C-terminal de la secuencia HOX
3
Extremo N-terminal de la secuencia HOX
ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVV
1
Péptido HOX D12 60 aminoácidos de la **Primera Región**
13
Opciones:
Proteína de fusión: sin conector (enlace peptídico solo)
Producto conjugado: conector
12
Extremo C-terminal
5
Extremo C-terminal
2
Péptido de carga de la **Segunda Región**

FIG. 2

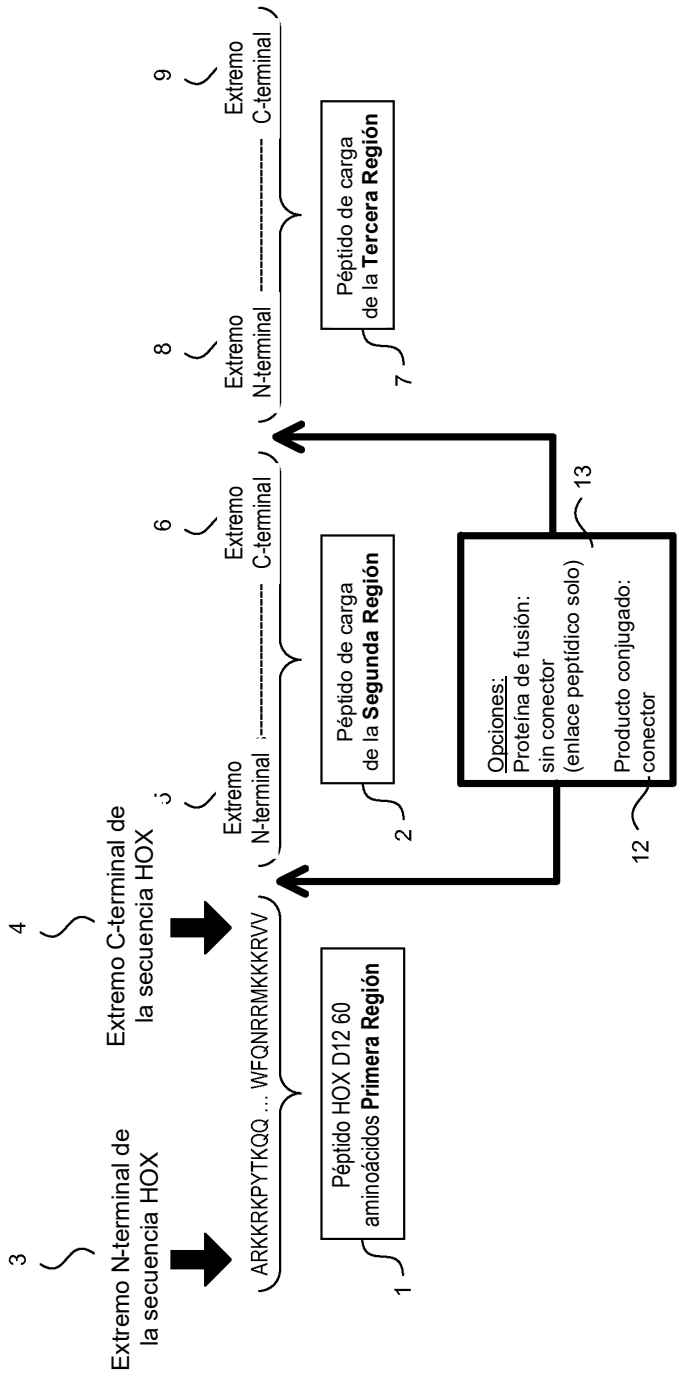
3
Extremo N-terminal de la secuencia HOX
4
Extremo C-terminal de la secuencia HOX
ARKKRKPYTKQQ ... WFQNRRMKKKRVV
Péptido HOX D12 60 aminoácidos **Primera Región**
1
5
Extremo N-terminal
6
Extremo C-terminal
Péptido de carga de la **Segunda Región**
2
Opciones:
Proteína de fusión:
sin conector
(enlace peptídico solo)
13
Producto conjugado:
conector
12
8
Extremo N-terminal
9
Extremo C-terminal
Péptido de carga de la **Tercera Región**
7

FIG. 3A

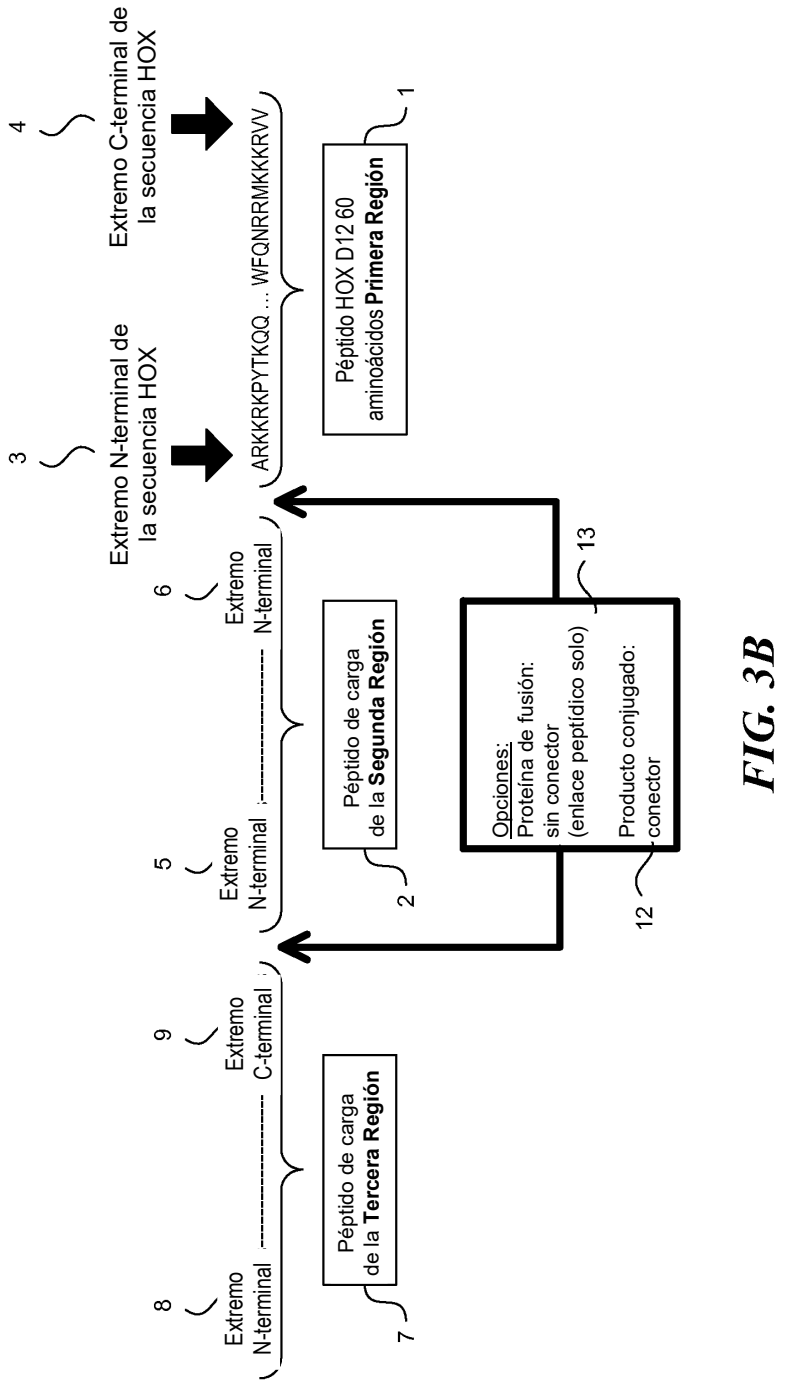
4
Extremo C-terminal de la secuencia HOX
3
Extremo N-terminal de la secuencia HOX
ARKKRKPYTKQQ ... WFQNRRMKKKRVV
Péptido HOX D12 60 aminoácidos Primera Región
1
6
Extremo N-terminal
Péptido de carga de la Segunda Región
2
5
Extremo N-terminal
Opciones:
Proteína de fusión:
sin conector
(enlace peptídico solo)
13
Producto conjugado:
conector
12
9
Extremo C-terminal
Péptido de carga de la Tercera Región
7
8
Extremo N-terminal

FIG. 3B

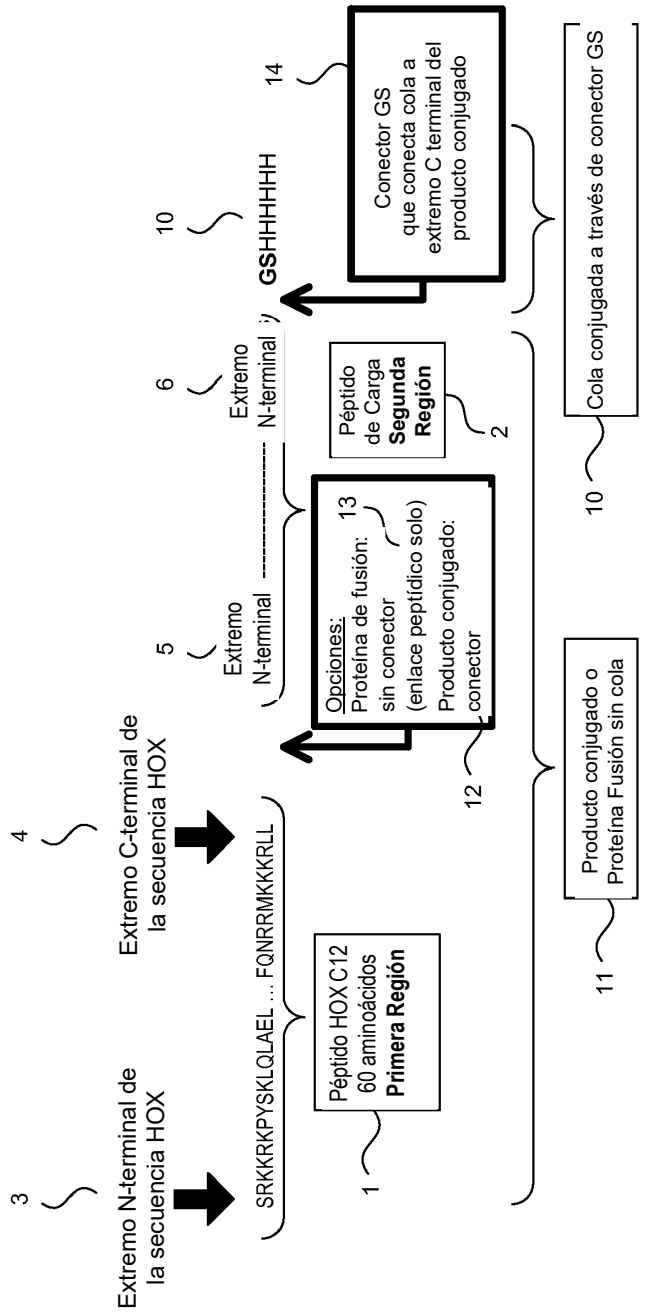
Extremo N-terminal de la secuencia HOX
3
Extremo C-terminal de la secuencia HOX
4
SRKKRKPYSKLQLAEL ... FQNRRMKKKRLL
Péptido HOX C12 60 aminoácidos Primera Región
1
Extremo N-terminal
5
Opciones:
Proteína de fusión: sin conector (enlace peptídico solo)
Producto conjugado: conector
13
12
Extremo N-terminal
6
Péptido de Carga Segunda Región
2
GSHHHHHH
10
Conector GS que conecta cola a extremo C terminal del producto conjugado
14
Producto conjugado o Proteína Fusión sin cola
11
Cola conjugada a través de conector GS
10

FIG. 4

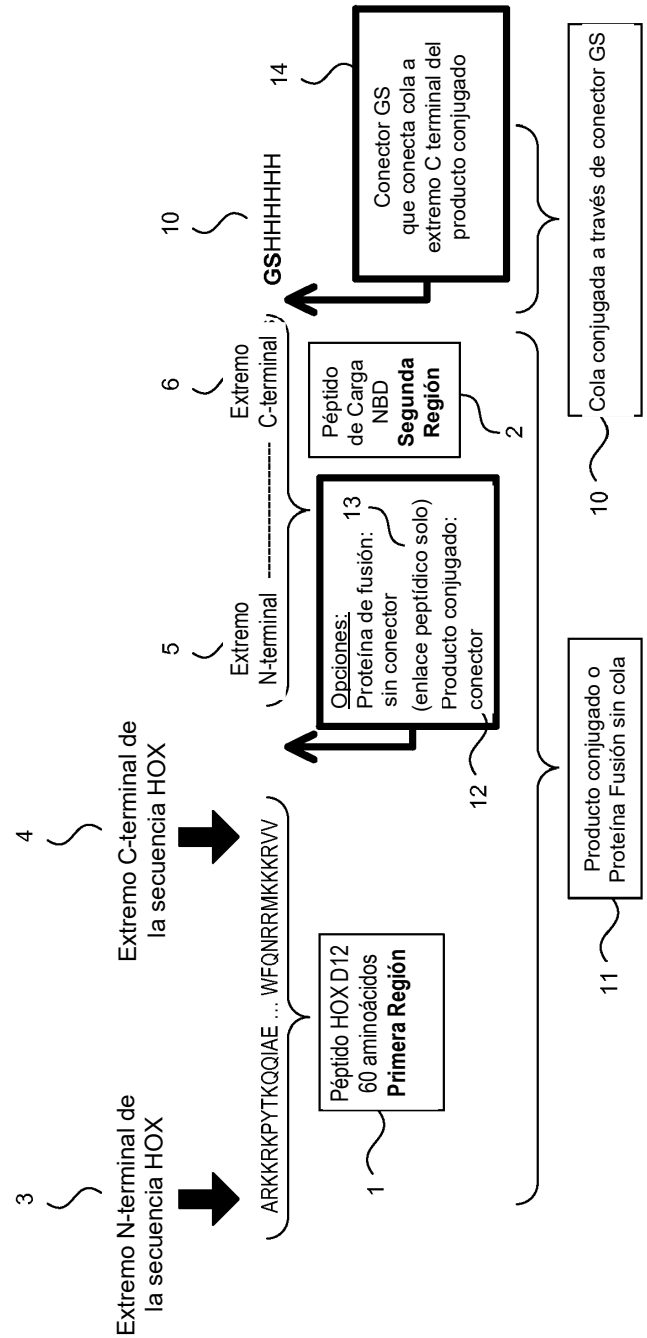
Extremo N-terminal de la secuencia HOX
3
Extremo C-terminal de la secuencia HOX
4
ARKKRKPYTKQQIAE ... WFQNRRMKKKRVV
Péptido HOX D12 60 aminoácidos Primera Región
1
Extremo N-terminal
5
Extremo C-terminal
6
GSHHHHHH
10
Opciones:
Proteína de fusión: sin conector (enlace peptídico solo)
Producto conjugado: conector
13
12
Péptido de Carga NBD Segunda Región
2
Conector GS que conecta cola a extremo C terminal del producto conjugado
14
Producto conjugado o Proteína Fusión sin cola
11
Cola conjugada a través de conector GS
10

FIG. 5

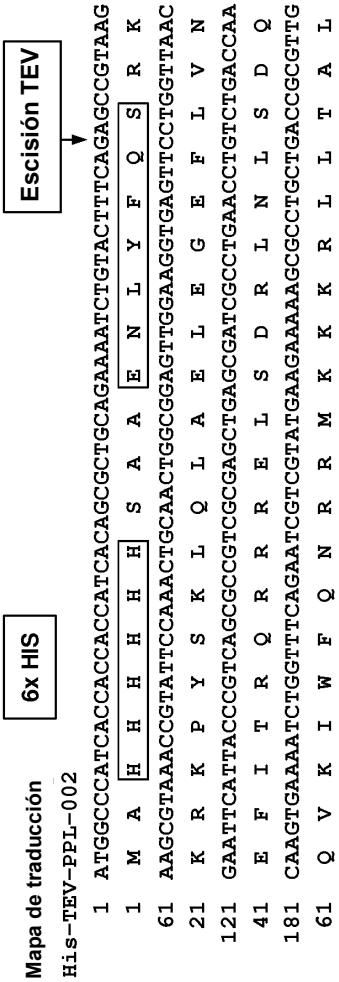
Mapa de traducción
6x HIS
Escisión TEV
His-TEV-PPL-002
1 ATGGCCCATCACCACCACCATCACAGCGCTGCAGAAAATCTGTACTTTCAGAGCCGTAAG
1 M A H H H H H H S A A E N L Y F Q S R K
61 AAGCGTAAACCGTATTTCCAAACTGCAACTGGCGGAGTTGGAAGGTGAGTTCCTGGTTAAC
21 K R K P Y S K L Q L A E L E G E F L V N
121 GAATTCATTACCCGTCAGCGCCGTCGCGAGCTGAGCGATCGCCTGAACCTGTCTGACCAA
41 E F I T R Q R R R E L S D R L N L S D Q
181 CAAGTGAAAATCTGGTTTCAGAATCGTCGTATGAAGAAAAAGCGCCTGCTGACCGCGTTG
61 Q V K I W F Q N R R M K K K R L L T A L
241 GACTGGAGCTGGCTGCAGACGGAG
81 D W S W L Q T E
His-TEV-PPL-002
Porcentaje GC: 51,568%

FIG. 6

6x HIS
Escisión TEV
Mapa de traducción
His-TEV-PPL-003
1 ATGGCTCATCACCACCATCACCACAGCGCAGCGGAGAACTTGTATTTTCAAGCCCGTAAG
1 M A H H H H H H S A A A E N L Y F Q A R K
61 AAACGTAAACCGTACACCAAGCAGCAAATTGCGGAGCTGGAGAATGAATTCCTGGTCAAT
21 K R K P Y T K Q Q I A E L E N E F L V N
121 GAATTCATCAACCGTCAGAAGCGCAAAGAACTGAGCAATCGCCTGAACCTGTCCGACCAG
41 E F I N R Q K R K E L S N R L N L S D Q
181 CAAGTGAAAATCTGGTTTCAAAACCGTCGCATGAAGAAACGTGTTGTTACGGCGCTG
61 Q V K I W F Q N R R M K K K R V V T A L
241 GATTGGAGCTGGCTGCAGACCGAG
81 D W S W L Q T E
His-TEV-PPL-003
Porcentaje GC: 48,780%

FIG. 7

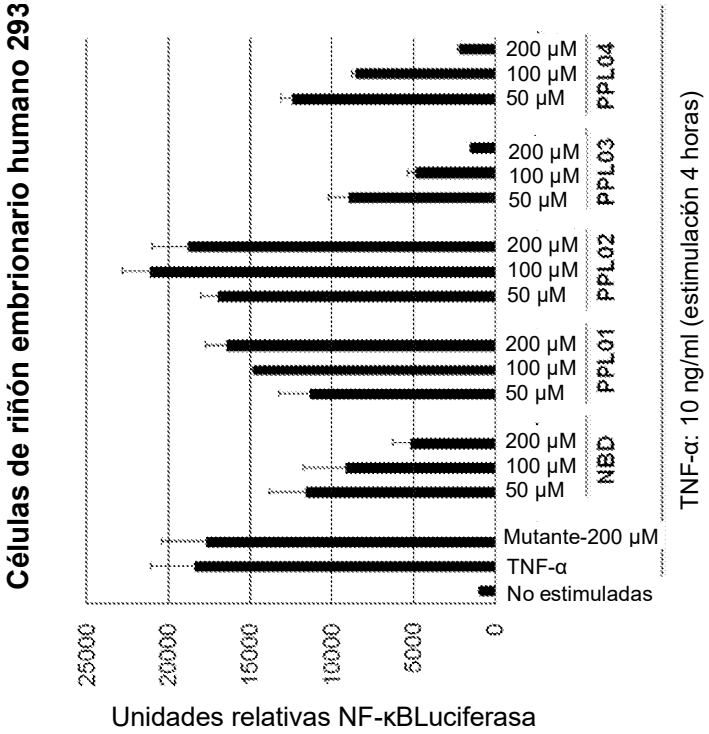
Células de riñón embrionario humano 293
Unidades relativas NF-κBLuciferasa
25000
20000
15000
10000
5000
0
200 µM
100 µM
50 µM
NBD
PPL01
PPL02
PPL03
PPL04
Mutante-200 µM
TNF-α
No estimuladas
TNF-α: 10 ng/ml (estimulación 4 horas)

FIG. 8B

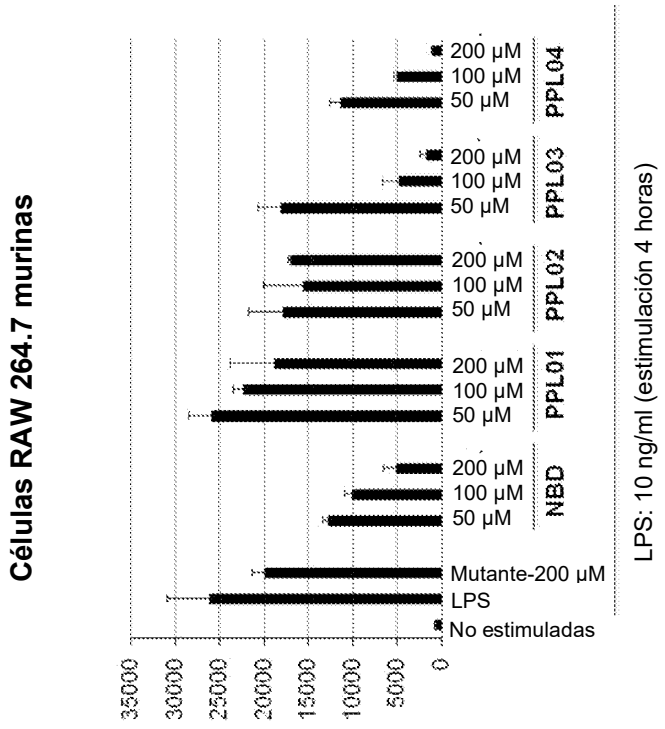
Células RAW 264.7 murinas
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
200 µM
100 µM
50 µM
NBD
PPL01
PPL02
PPL03
PPL04
Mutante-200 µM
LPS
No estimuladas
LPS: 10 ng/ml (estimulación 4 horas)

FIG. 8A

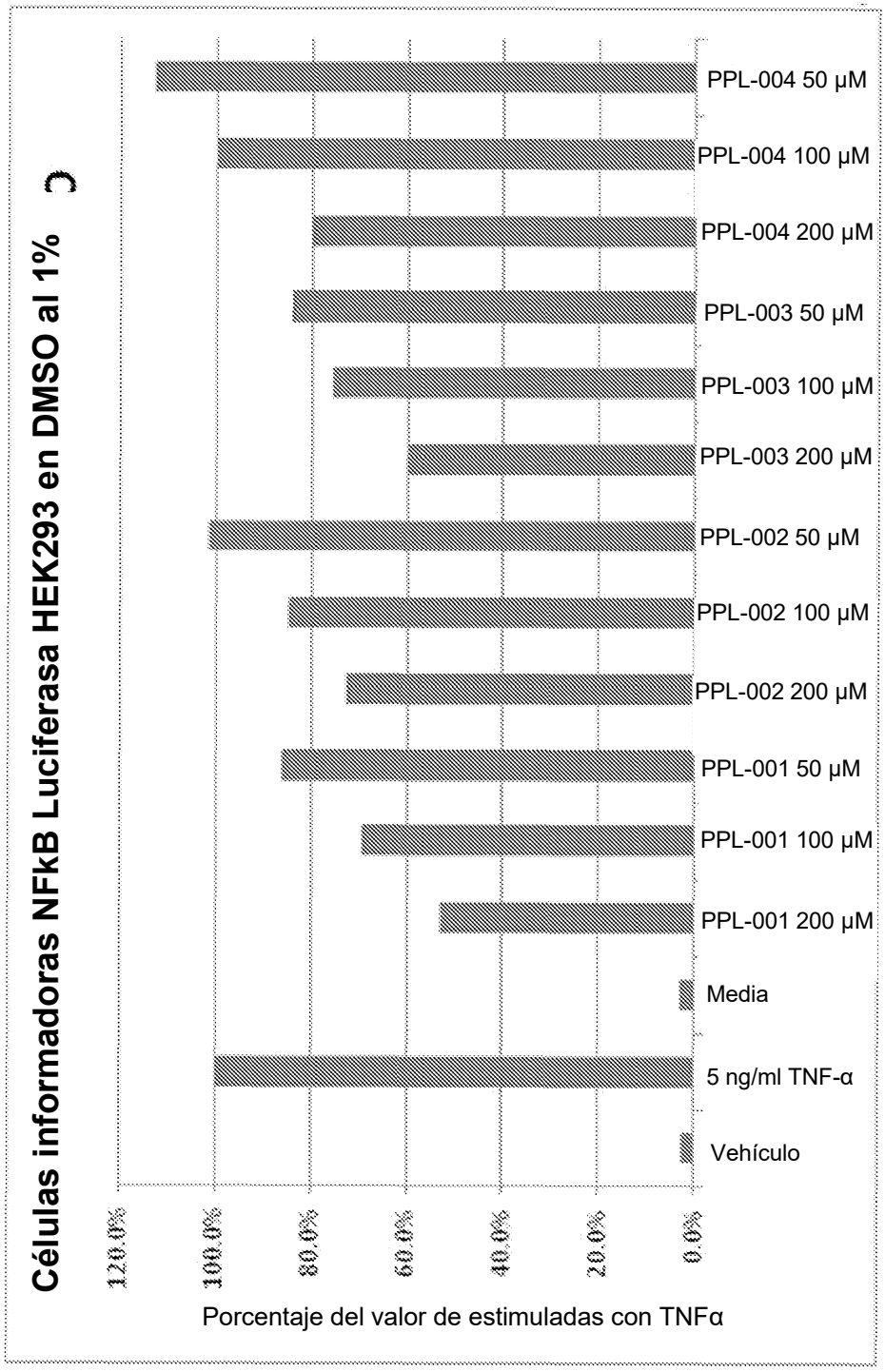
Células informadoras NFkB Luciferasa HEK293 en DMSO al 1%
PPL-004 50 µM
PPL-004 100 µM
PPL-004 200 µM
PPL-003 50 µM
PPL-003 100 µM
PPL-003 200 µM
PPL-002 50 µM
PPL-002 100 µM
PPL-002 200 µM
PPL-001 50 µM
PPL-001 100 µM
PPL-001 200 µM
Media
5 ng/ml TNF-α
Vehículo
120.0%
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
Porcentaje del valor de estimuladas con TNFα

FIG. 9

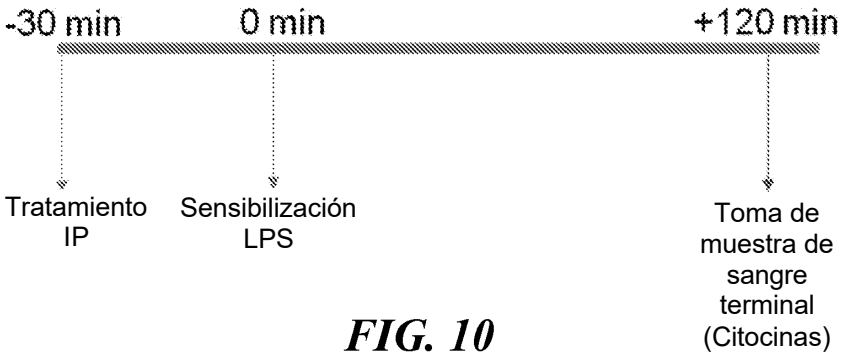
-30 min
0 min
+120 min
Tratamiento IP
Sensibilización LPS
Toma de muestra de sangre terminal (Citocinas)

FIG. 10

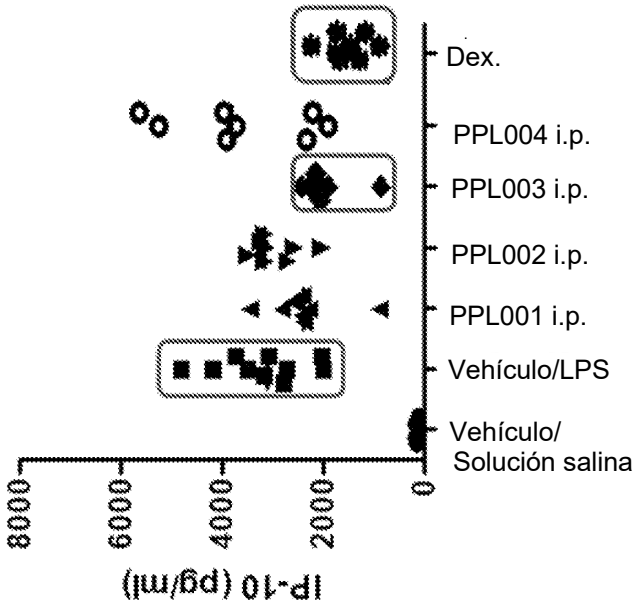

FIG. 11B

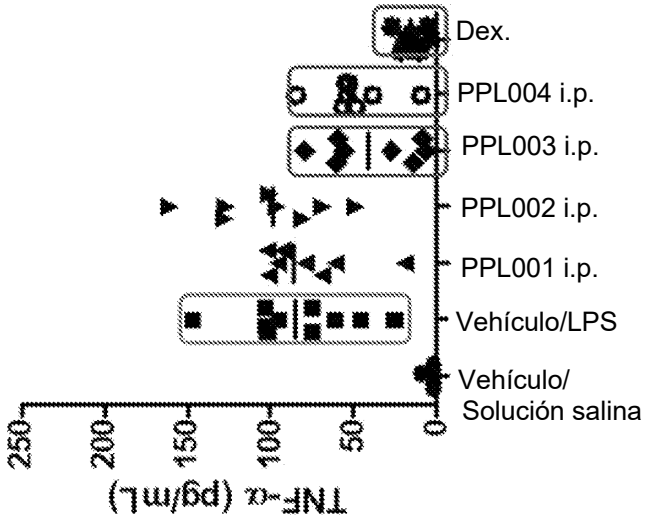

FIG. 11A

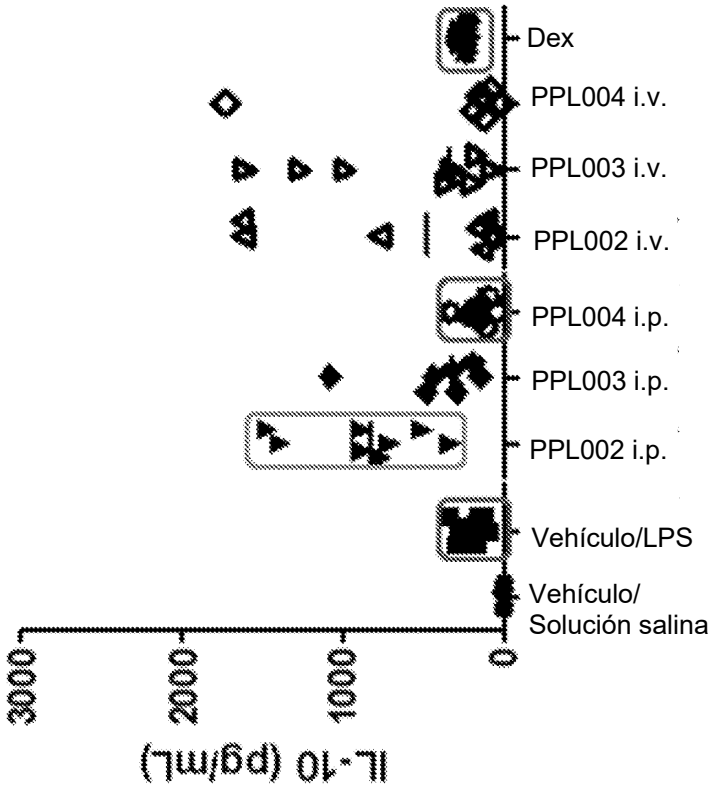
Dex
PPL004 i.v.
PPL003 i.v.
PPL002 i.v.
PPL004 i.p.
PPL003 i.p.
PPL002 i.p.
Vehículo/LPS
Vehículo/
Solución salina
3000
2000
1000
0
IL-10 (pg/mL)

FIG. 12

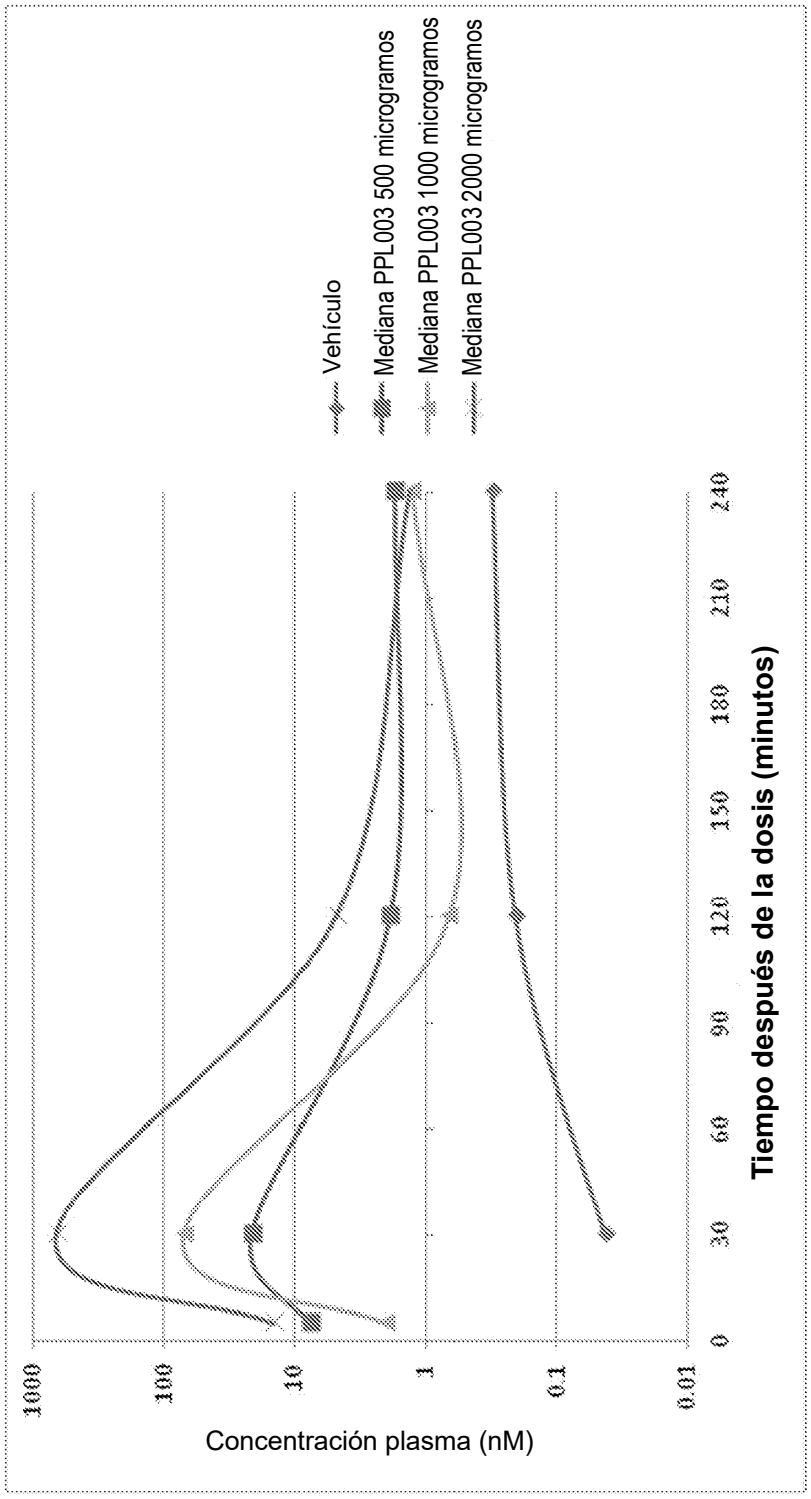
Vehículo
Mediana PPL003 500 microgramos
Mediana PPL003 1000 microgramos
Mediana PPL003 2000 microgramos
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
30
60
90
120
150
180
210
240
Concentración plasma (nM)
Tiempo después de la dosis (minutos)

FIG. 13

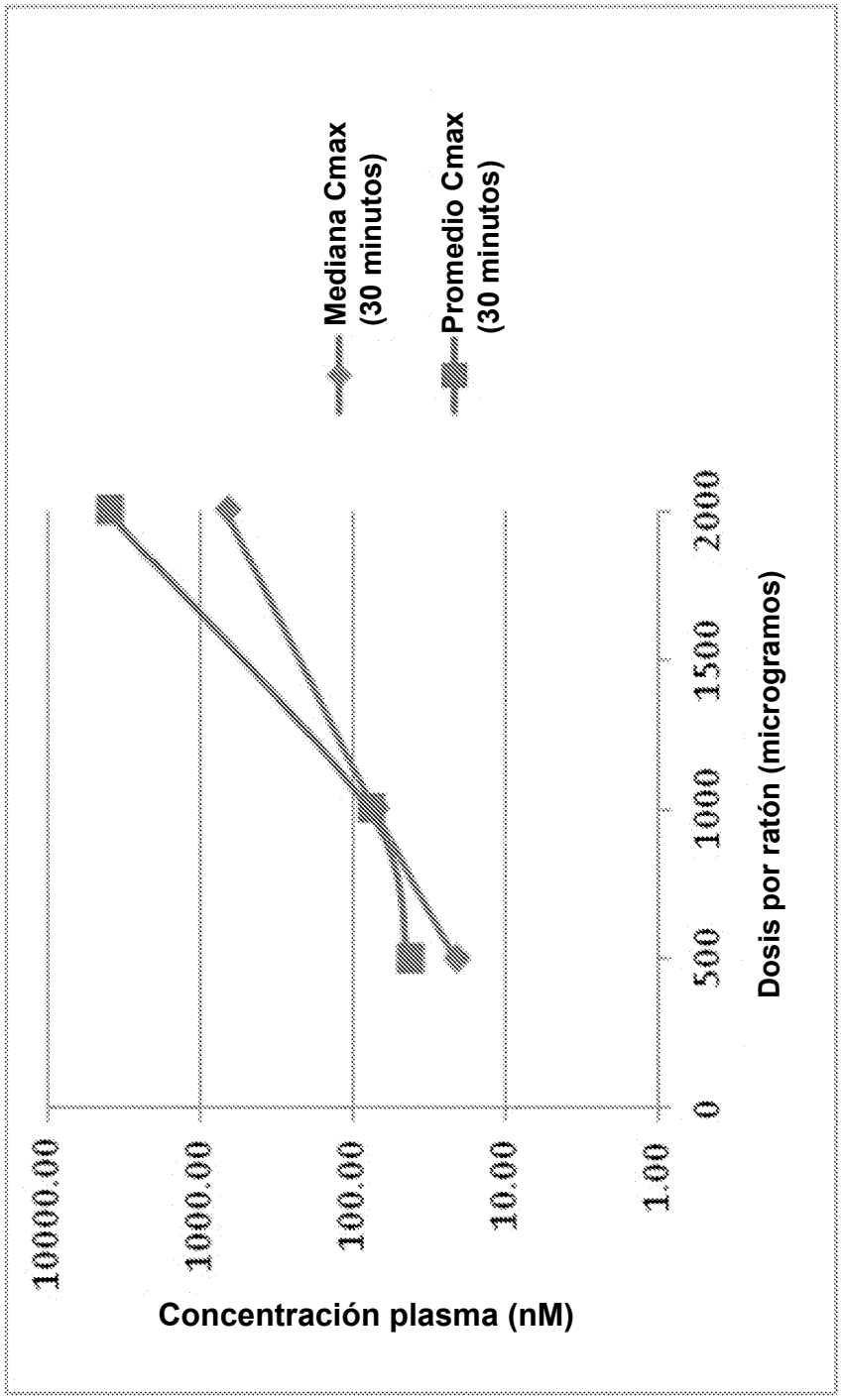
Mediana Cmax
(30 minutos)
Promedio Cmax
(30 minutos)
10000,00
1000,00
100,00
10,00
1,00
Concentración plasma (nM)
0
500
1000
1500
2000
Dosis por ratón (microgramos)

FIG. 14

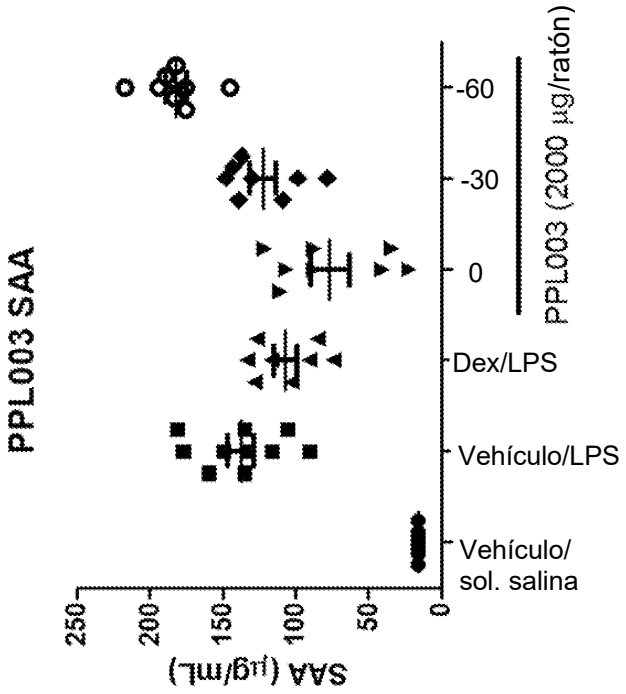

FIG. 15B

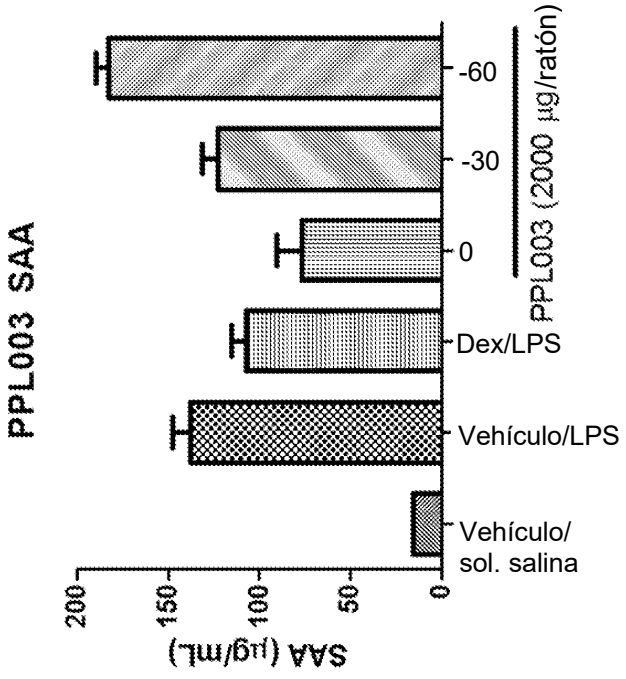

FIG. 15A

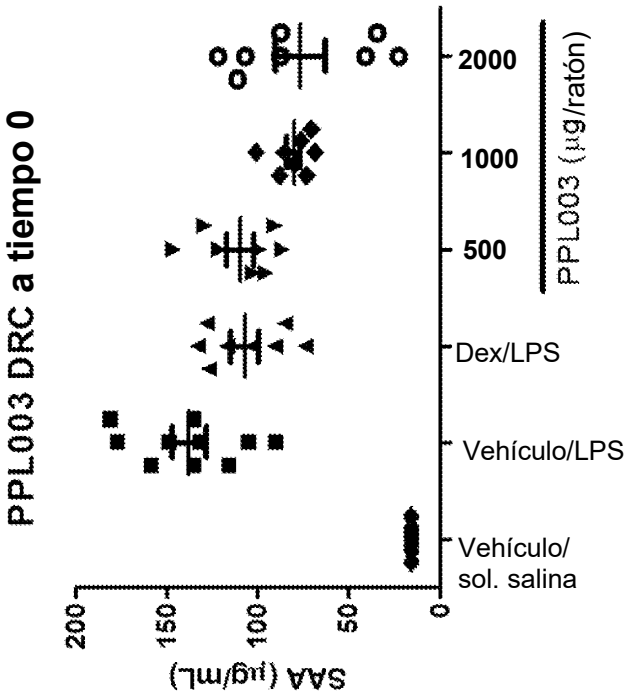

FIG. 16B

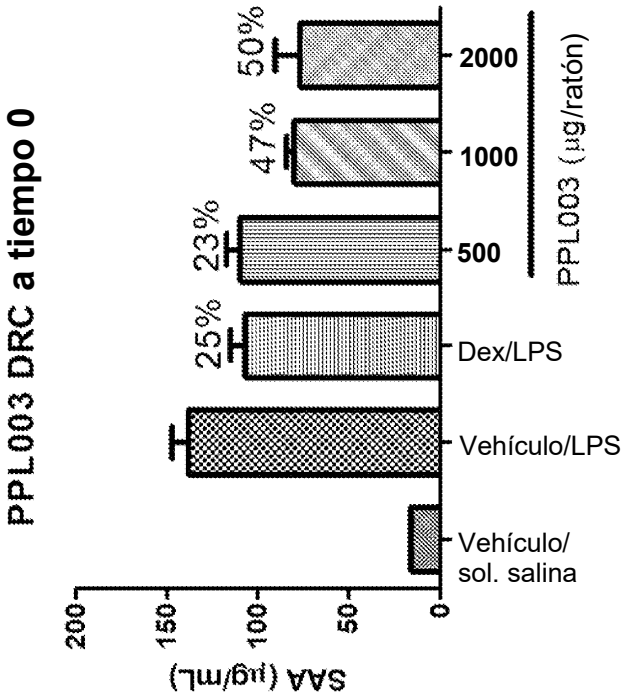

FIG. 16A

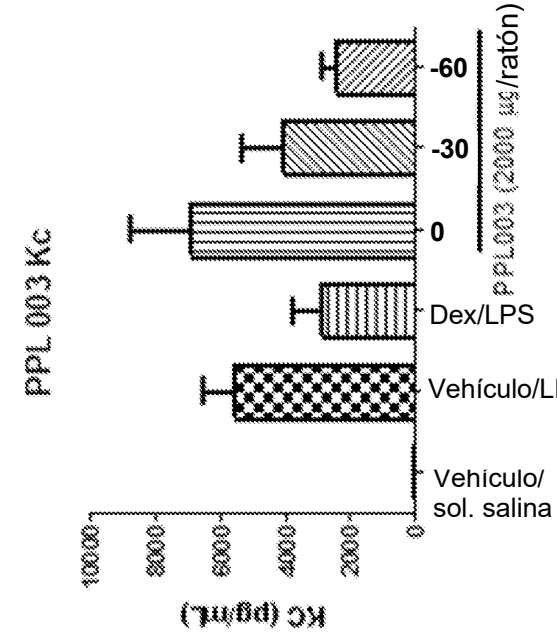

FIG. 17B

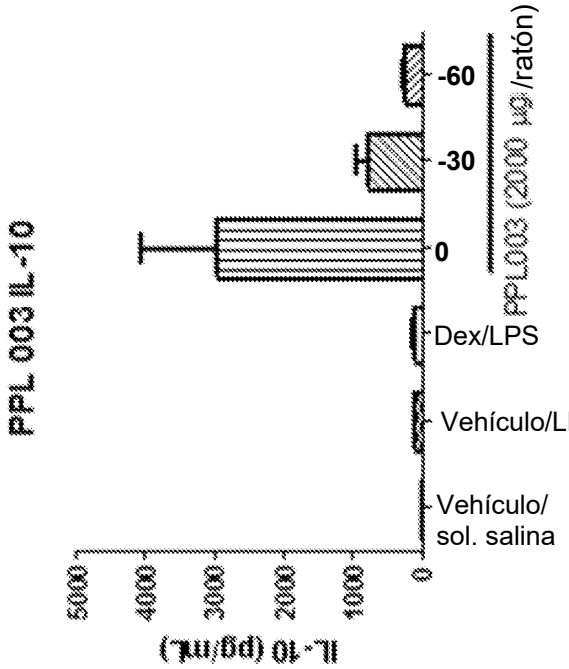

FIG. 17A

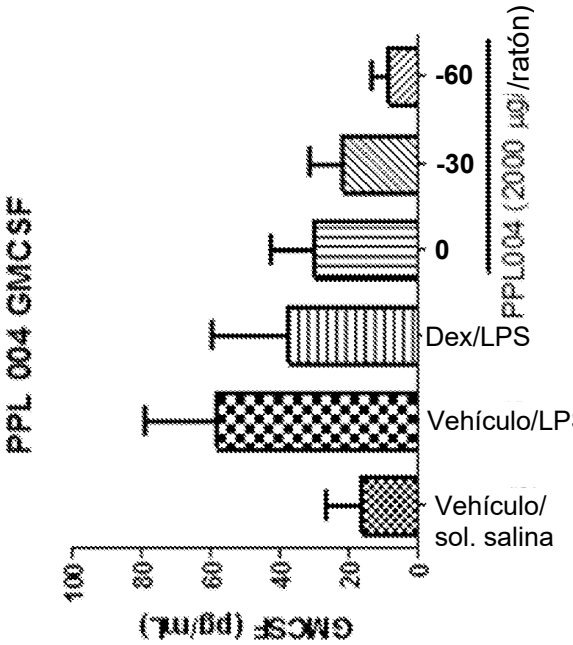

FIG. 18B

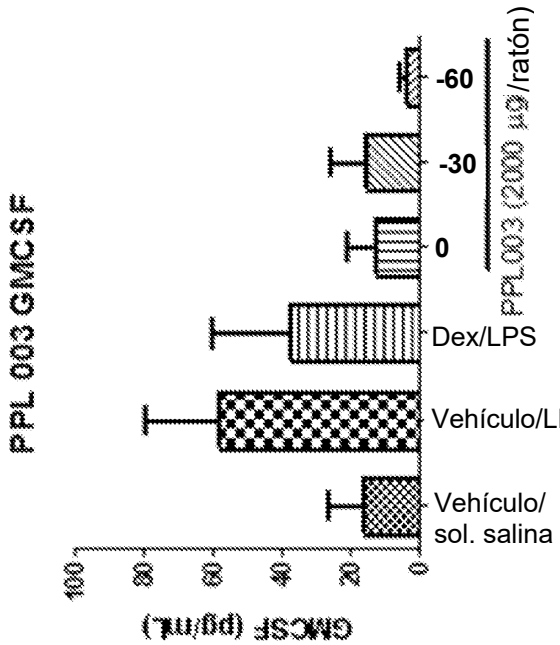

FIG. 18A