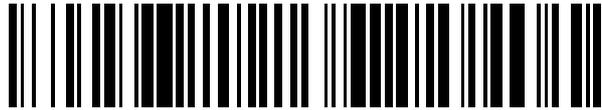


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 785**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2009 PCT/EP2009/009229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10072406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09801170 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2361260**

54 Título: **Nuevos constructos transportadores y moléculas conjugadas transportador-carga**

30 Prioridad:

22.12.2008 WO PCT/EP2008/011003
02.06.2009 WO PCT/EP2009/003927

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2017

73 Titular/es:

XIGEN INFLAMMATION LTD. (100.0%)
Arch. Makariou III, 195 Neocleous House
3030 Limassol, CY

72 Inventor/es:

BONNY, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 602 785 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos constructos transportadores y moléculas conjugadas transportador-carga.

- 5 La presente invención se refiere a nuevos constructos transportadores de fórmula genérica (I) $D_1LLL_xD_m(LLL_yD_n)_a$ y variantes de los mismos. La presente invención también se refiere a moléculas conjugadas transportador-carga, en particular a conjugados de los nuevos constructos transportadores con una fracción de carga, por ejemplo proteínas o péptidos, ácidos nucleicos, agentes citotóxicos, moléculas orgánicas, etc. Además, la presente invención describe composiciones (farmacéuticas) que comprenden estos conjugados y métodos de tratamiento y usos que implican a estos constructos transportadores.
- 10 Las técnicas que posibilitan una transferencia eficiente de una sustancia de interés desde el medio externo hasta el interior de tejidos o células, y en particular de núcleos celulares, como ácidos nucleicos, proteínas o agentes citotóxicos, pero también otros compuestos (terapéuticamente útiles) tienen un interés considerable en el campo de la biotecnología. Estas técnicas pueden ser adecuadas para el transporte y la traducción de ácidos nucleicos al interior de células *in vitro* e *in vivo* y, por tanto, para producir proteínas o péptidos, para regular la expresión génica, para inducir efectos citotóxicos o apoptóticos, para el análisis de procesos intracelulares y para el análisis del efecto del transporte de diversas diferentes cargas al interior de una célula (o núcleo celular), etc.
- 15 Una aplicación importante de una transferencia de este tipo de una carga de interés desde el medio externo al interior de tejidos o células es la terapia génica, donde la carga consiste normalmente en un ácido nucleico o un gen. Aunque esta técnica ha demostrado algunos desarrollos bastante prometedores en las últimas décadas, la transferencia genética está limitada normalmente por la incapacidad de los vectores de transferencia genética de transferir efectivamente la carga biológicamente activa al interior del citoplasma o a los núcleos celulares del huésped a tratar sin afectar al genoma huésped o alterar las propiedades biológicas de la carga activa.
- 20 A este respecto, se han desarrollado varias técnicas en un intento de lograr una transfección más eficiente dentro de células, por ejemplo de ácidos nucleicos como ADN o ARN. La transfección de ácidos nucleicos dentro de células o tejidos de pacientes mediante métodos de transferencia genética es un método principal de la medicina molecular y desempeña un papel crítico en la terapia y la prevención de numerosas enfermedades.
- 25 Ejemplos representativos de métodos de transferencia genética incluyen métodos (físicos o físico-químicos) generales, como la coprecipitación de ácidos nucleicos con fosfato de calcio o DEAE-dextrano, un método que permite que los ácidos nucleicos penetren en la membrana plasmática y después entren en la célula y/o el núcleo. Sin embargo, esta técnica adolece de una baja eficiencia de transferencia y un alto porcentaje de muerte celular. Además, este método está limitado a métodos *in vitro* o *ex vivo* y no es aplicable a situaciones *in vivo* debido a su propia naturaleza.
- 30 Lo mismo ocurre con métodos que implican una electroporación *in vitro*. La electroporación *in vitro* se basa en el uso de una corriente de alta tensión para que las membranas celulares se vuelvan permeables con el fin de permitir la introducción de nuevos ácidos nucleicos, por ejemplo ADN o ARN, en la célula. Sin embargo, estos métodos normalmente no son adecuados *in vivo*. Además, esta técnica también adolece de una baja eficiencia de transferencia y un alto porcentaje de muerte celular.
- 35 Otros métodos físicos o físico-químicos bien conocidos incluyen la inyección (directa) de ácidos nucleicos (desnudos) o la transferencia genética biolística. La transferencia genética biolística (también conocida como bombardeo de partículas biolístico) es un método desarrollado en la Universidad de Cornell que permite introducir material genético en tejidos o células en cultivo. La transferencia genética biolística se realiza normalmente mediante partículas metálicas de revestimiento superficial, como partículas de oro o plata, disparando estas partículas metálicas, que comprenden el ADN adsorbido, al interior de células utilizando una pistola genética. De modo similar al arriba descrito, este método está limitado a métodos *in vitro* o *ex vivo* y normalmente no es aplicable a situaciones *in vivo*.
- 40 Otros métodos utilizan la capacidad de transporte de las llamadas moléculas transportadoras. Las moléculas transportadoras útiles en este contexto se pueden dividir habitualmente en vectores virales, es decir, moléculas transportadoras que incluyen elementos virales, y vectores no virales.
- 45 Las estrategias de terapia génica más exitosas actualmente disponibles se basan en vectores virales, como adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y virus herpes. Estos vectores virales emplean habitualmente un conjugado de una sustancia relacionada con el virus con una fuerte afinidad por el ADN y un ácido nucleico. Debido a sus propiedades de infección, los virus o vectores virales tienen una tasa de transfección muy alta.
- 50 Los vectores virales normalmente utilizados están modificados genéticamente de modo que en la célula

transfectada no se forma ninguna partícula infecciosa funcional. Sin embargo, a pesar de esta precaución de seguridad, existen muchos problemas asociados a los vectores virales relacionados con la inmunogenicidad, citotoxicidad y mutagénesis insercional. Por ejemplo, no se puede descartar el riesgo de propagación incontrolada de los genes terapéuticamente activos o de los genes virales introducidos, por ejemplo debido a posibles eventos de recombinación. Además, los conjugados virales son difíciles de utilizar y normalmente requieren una larga preparación antes del tratamiento (véase, por ejemplo, la Patente US 5.521.291).

Aunque los vectores no virales no son tan eficientes como los vectores virales, muchos se han desarrollado para proporcionar una alternativa más segura en la terapia génica. Algunos de los vectores no virales más comunes incluyen polietilenimina, dendrímeros, quitosano, polilisina y sistemas transportadores basados en péptidos, por ejemplo muchos tipos de péptidos que, en general, son de naturaleza catiónica y pueden interactuar con ácidos nucleicos tales como ADN plasmídico mediante interacciones electrostáticas.

Para lograr un suministro eficaz, los vectores no virales, en particular los sistemas transportadores basados en péptidos, deben poder superar muchas barreras. Estas barreras incluyen la protección de la fracción de carga, por ejemplo de ADN u otros compuestos, durante el transporte y la prevención de una degradación o metabolización temprana de la fracción de carga *in vivo*. En el caso de los ácidos nucleicos, como moléculas de ADN y ARN, los vectores no virales además deben poder suministrar específicamente estas moléculas para una expresión genética eficiente en las células diana.

En particular para los ácidos nucleicos como moléculas de ADN y ARN, actualmente existen 4 barreras que deben superar los vectores no virales para lograr un suministro genético eficaz (véase, por ejemplo, Martín y col., *The AAPS Journal* 2007; 9 (1) Artículo 3). El vector no viral 1) debe poder compactar firmemente y proteger los ácidos nucleicos, 2) debe poder dirigirse a receptores de superficie celular específicos, 3) el vector no viral debe poder romper la membrana endosomal, y 4) debe suministrar la carga de ácido nucleico al núcleo y permitir la traducción de una secuencia de péptidos o proteínas codificada.

Estos vectores no virales, en particular vectores no virales basados en péptidos, resultan ventajosos en comparación con otras estrategias no virales, ya que en general pueden alcanzar estos 4 objetivos, pero con diferente eficacia en lo que respecta a las diferentes barreras.

Por ejemplo, los péptidos catiónicos ricos en residuos básicos, como lisina y/o arginina, pueden condensar eficientemente ácidos nucleicos como el ADN en pequeñas partículas compactas que se pueden estabilizar en suero. Además, la unión de un ligando peptídico al políplex permite dirigirlo a receptores específicos y/o a tipos de células específicos. Los políplexes o polímeros catiónicos tal como se menciona más arriba forman normalmente un complejo con los ácidos nucleicos de carga negativa, que conduce a una condensación de ácidos nucleicos y a una protección de estos ácidos nucleicos contra la degradación. El transporte en células utilizando políplexes (polímeros catiónicos) se realiza normalmente por endocitosis mediada por receptores. Así, el ADN se acopla a una molécula distinta, como transferrina, por ejemplo a través de la poli-L-lisina (PLL) del políplex, que se une a un receptor de superficie y dispara la endocitosis. Los políplexes (polímeros catiónicos) incluyen por ejemplo poli-L-lisina (PLL), quitosano, polietilenimina (PEI), polidimetilaminoetilmetacrilato (PD-MAEMA), poliamidoamina (PAMAM). Estos efectos también son conocidos en nanoplexes (sistemas nanoparticulados) o lipoplexes (sistemas liposomales). Los nanoplexes (sistemas nanoparticulados) implican normalmente el uso de poliácridatos, poliamidas, poliestireno, cianoacrilatos, polilactato (PLA), ácido poli(láctico-coglicólico) (PLGA), etc. Los lipoplexes o sistemas liposomales implican normalmente el uso de lípidos catiónicos que pueden imitar una membrana celular. De este modo, la fracción de carga positiva del lípido interactúa con la fracción de carga negativa del ácido nucleico, permitiendo la fusión con la membrana celular. Los lipoplexes o sistemas liposomales incluyen, por ejemplo, DOTMA, DOPE, DOSPA, DOTAP, DC-Chol, EDMPC, etc.

En este contexto, la endocitosis mediada por receptores también se ha utilizado ampliamente en sistemas experimentales para el suministro dirigido de cargas tales como ácidos nucleicos o agentes terapéuticos al interior de las células. Durante la endocitosis mediada por receptores, los complejos que contienen las cargas son internalizados selectivamente por receptores localizados en la membrana celular que son específicos para las cargas, o por anticuerpos específicos localizados en constituyentes de la membrana. Ya se ha descrito la actividad endocítica en relación con muchos receptores, incluyendo IgG Fc, somatostatina, insulina, IGF-I y -II, transferrina, EGF, GLP-1, VLDL o receptores de integrina, etc.

Se han ensayado ampliamente diferentes secuencias de péptidos o proteínas para su uso en métodos de transferencia genética mediante endocitosis mediada por receptores. De forma interesante, el aislamiento de secuencias peptídicas que dirigen una endocitosis eficiente mediada por receptores se ha potenciado profundamente mediante el uso de tecnologías *phage display* (presentación de fagos). Las bibliotecas de *phage display* son herramientas extremadamente potentes que proporcionan una fuente prácticamente ilimitada de variantes moleculares, incluyendo modificaciones de ligandos naturales o fracciones de carga

para receptores celulares y péptidos cortos. También se han inyectado bibliotecas similares directamente en ratones y se han aislado con éxito secuencias de péptidos que muestran una selectividad 13 veces mayor en relación con el cerebro y los riñones.

5 Las proproteína convertasas pueden servir como ejemplo de secuencias de péptidos o proteínas que pueden emplearse para el transporte de moléculas al interior de las células. Las proproteína convertasas son un ejemplo de un receptor de superficie celular que se internaliza mediante endocitosis mediada por receptores. Estas proteínas han demostrado ser responsables de la conversión de precursores de hormonas peptídicas, neuropéptidos y muchas otras proteínas en sus formas biológicamente activas. Todos los sitios de corte para la familia de las proproteína convertasas cumplen el consenso R-X-X-R. Las proproteína convertasas de mamíferos se pueden clasificar en tres grupos según su distribución tisular. La furina, PACE4, PC5/PC6 y 10 LPCIPC7/PC8/SPC7 son expresados en una amplia gama de tejidos y líneas celulares. En cambio, la expresión de PC2 y PC1/PC3 está limitada a tejidos neuroendocrinos, como islotes pancreáticos, hipófisis, médula suprarrenal y muchas áreas del cerebro. La expresión de PC4 está muy limitada a células espermatogénicas testiculares. Las convertasas específicas neuroendocrínicas, PC2 y PC1/PC3, están 15 localizadas principalmente en gránulos secretores. Además, la evidencia indirecta ha sugerido que una proporción de moléculas de proproteína convertasas está presente sobre la superficie celular y se ha comprobado que la furina realiza ciclos entre el TGN y la superficie celular. En conjunto, estas propiedades indican que las proproteína convertasas transportan ligandos extracelulares al espacio intracelular.

20 También resultan ventajosas las llamadas proteínas de translocación o los dominios de transducción de proteínas (PTD). Las secuencias de péptidos derivadas de proteínas de translocación o dominios de transducción de proteínas (PTD) normalmente pueden realizar una lisis selectiva de la membrana endosomal en su entorno ácido, conduciendo a una liberación citoplasmática del políplex. Las proteínas de translocación se consideran como un grupo de péptidos capaces de realizar el transporte de macromoléculas entre células (proteínas de translocación), como VIH-1 TAT (VIH), antennapedia (*Drosophila antennapedia*), VHS VP22 25 (*Herpes simplex*), FGF o lactoferrina, etc. En cambio, los dominios de transducción de proteínas (PTD) se consideran como un grupo de péptidos capaces de dirigir proteínas y péptidos unidos de forma covalente con estas secuencias al interior de una célula a través de la membrana celular (Leifert y Whitton: Translocatory proteins and protein transduction domains: a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. Molecular Therapy Vol. 8 N° 1 2003). Las proteínas de translocación y los PTD tienen en común 30 una región básica considerada como la principal responsable del transporte de los péptidos de fusión, ya que puede unir polianiones tales como ácidos nucleicos. Sin pretender ninguna vinculación definitiva a esta teoría, los PTD pueden actuar de modo similar a reactivos de transfección catiónica utilizando endocitosis de adsorción no saturable dependiente de receptores. Los PTD se acoplan normalmente con proteínas o péptidos para efectuar o aumentar una respuesta CTL cuando se administra una vacuna basada en péptidos (véase el análisis: Melikov y Chernomordik, Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery, Cell. Mol. Life Sci. 2005). 35

El documento US 6740524 B1 describe un fago que expresa en su cabeza una proteína bifuncional que presenta actividades de translocación nuclear y adhesión celular, por lo cual la proteína TAT del VIH puede ser utilizada como una proteína bifuncional de este tipo. El fago se utiliza para empaquetar una sustancia 40 extraña, como un gen, y puede ser útil en la terapia génica. Además, se describen proteínas de fusión que comprenden una proteína TAT y una proteína de cabeza de fago lambda.

El documento WO 02/065986 A2 describe composiciones y métodos para mejorar el transporte de compuestos biológicamente activos a través de membranas biológicas y a través y dentro de estructuras 45 epiteliales y endoteliales animales. La composición incluye un agente activo y una fracción de transporte.

Desafortunadamente, los sistemas transportadores basados en péptidos normalmente experimentan una degradación proteolítica *in vivo* debido a las peptidasas que conducen a secuencias transportadores (y/o de carga) truncadas. Estas peptidasas se pueden diferenciar entre exopeptidasas y endopeptidasas, en ambos 50 casos enzimas capaces de catalizar la división de proteínas en fracciones peptídicas más pequeñas e incluso en aminoácidos simples mediante un proceso conocido como proteólisis. En este contexto, las endopeptidasas son normalmente peptidasas proteolíticas que rompen los enlaces peptídicos de aminoácidos no terminales (es decir, dentro de la molécula). Las endopeptidasas son normalmente específicas para determinados aminoácidos. Ejemplos de endopeptidasas incluyen, por ejemplo, tripsina, quimotripsina, elastasa, termolisina, pepsina y endopeptidasa V, etc. Es sabido que la tripsina se disocia detrás de Arg o Lys, a no ser que vaya seguida por una Pro. Se sabe que la quimotripsina se disocia detrás de Phe, Trp o Tyr, a no ser que vaya seguida por una Pro. La quimotripsina se disocia más lentamente detrás de Asn, His, Met o Leu. La elastasa se disocia detrás de Ala, Gly, Ser o Val, a no ser que vaya seguida por una Pro. La termolisina es una endoproteasa termoestable, que se disocia *delante de* lie, Met, Phe, Trp, Tyr, o Val, a no ser que vaya *precedida* por una Pro. La termolisina se disocia a veces detrás de Ala, Asp, His o Thr. Se sabe que la pepsina se disocia *delante de* Leu, Phe, Trp o Tyr, a no ser que vaya *precedida* por una 55

Pro. Por último, se sabe que la endopeptidasa V8 se disocia detrás de Glu. A diferencia de las endopeptidasas, las exopeptidasas son enzimas que catalizan la eliminación de un aminoácido del extremo de una cadena polipeptídica y así disocian el extremo de dicha cadena polipeptídica. Las exopeptidasas se diferencian entre aminopeptidasas y carboxipeptidasas, dependiendo de su sitio de corte. Las aminopeptidasas son normalmente enzimas dependientes de zinc y son producidas por glándulas del intestino delgado. Las aminopeptidasas normalmente disocian un aminoácido simple del extremo aminoterminal de una secuencia de péptidos o proteínas. Las carboxipeptidasas son normalmente enzimas que hidrolizan el extremo carboxiterminal (C-terminal) de un enlace peptídico. Humanos, animales y plantas contienen diversos tipos de carboxipeptidasas con diversas funciones, que van desde el catabolismo hasta la maduración proteínica, que consisten en una enzima digestiva presente en jugos pancreáticos y que disociará un aminoácido simple del extremo carboxílico del péptido. Un ejemplo particular es la Carboxipeptidasa N (CPN), una metaloproteasa de zinc plasmática formada por dos subunidades pequeñas que tienen actividad enzimática y dos subunidades grandes que protegen la enzima de la degradación. La CPN disocia los aminoácidos carboxilo-terminales arginina y lisina de péptidos biológicamente activos tales como anafilotoxinas de complemento, quininas y fibrinopéptidos.

Con el fin de modificar la disociación proteolítica mediante sistemas transportadores basados en péptidos tal como se define más arriba, los sistemas transportadores basados en péptidos pueden estar compuestos en su totalidad por D-aminoácidos, formando así "secuencias peptídicas retroinversas". El concepto "secuencias (de péptidos) retroinversas" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal donde la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo aminoácido está invertida (véase, por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693 (1994)). La ventaja de combinar aminoácidos D-enantioméricos y síntesis inversa consiste en que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amídico se intercambian, mientras que la posición de los grupos de la cadena lateral en cada carbono alfa se conserva. Gracias al cambio conformacional de los aminoácidos L-enantioméricos naturales de la secuencia peptídica de péptido basado en un transportador a aminoácidos D-enantioméricos, se elimina el riesgo de disociación proteolítica *in vivo*, lo que resulta ventajoso y sumamente eficaz para los fines de transfección de una fracción de carga al interior de una célula. En cambio, el concepto "secuencia inversa" se refiere a una secuencia donde la dirección está invertida (pero la quiralidad de cada residuo aminoácido no está invertida (por ejemplo D-Arg-L-Arg-L-Arg → L-Arg-L-Arg-D-Arg)).

Sin embargo, aunque funciona eficazmente como una molécula transportadora tal como se define más arriba, el cambio de conformación de los aminoácidos L-enantioméricos naturales de la secuencia peptídica de dicho transportador basado en péptidos a aminoácidos D-enantioméricos implica el riesgo de una acumulación predominante de estos transportadores en la célula durante toda la vida de la célula o incluso durante más tiempo en el tejido (circundante) o en el organismo. Por tanto, estos transportadores, aunque la fracción de carga unida se disocie o sea metabolizada entre tanto, pueden permanecer en las células y participar en otros procesos intercelulares e intracelulares, conduciendo a efectos secundarios desconocidos y no deseados.

Por consiguiente, en la técnica existe la necesidad de disponer de moléculas transportadores no virales alternativas, preferentemente sistemas transportadores basados en péptidos tal como se definen más arriba, que eviten esta acumulación no deseada en la célula o en tejidos y que no obstante posibiliten una transferencia eficiente de fracciones de carga al interior de las células.

Este objeto se resuelve mediante la materia objeto tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, en particular mediante un nuevo constructo transportador y sus conjugados (molécula conjugada transportador-carga) tal como se define en las reivindicaciones. El objeto arriba indicado se resuelve además mediante métodos y usos que emplean el nuevo constructo transportador y sus conjugados tal como se definen en las reivindicaciones.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, el objeto de la presente invención se resuelve mediante un nuevo constructo transportador que comprende o consiste en al menos un patrón D/L de fórmula genérica (I) (SEQ ID N°: 1):



donde: D es un D-aminoácido;
 L es un L-aminoácido;
 a es 0 - 3, preferentemente 0 - 2, de forma especialmente preferente 0, 1, 2 o 3, de forma incluso más preferente 0, 1 o 2 y de forma totalmente preferente 1;
 l, m y n son, independientemente entre sí, 1 o 2, preferentemente 1;
 x e y son, independientemente entre sí, 0, 1 o 2, preferentemente 1;

ES 2 602 785 T3

en particular el constructo tranpostador comprendiendo al menos un patrón D/L de acuerdo con una de las siguientes subfórmulas (la) a (lf):

- 5
- (la): $D_1 L L L_x D_m$;
 - (lb): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n$;
 - (lc): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n L L L_y D_n$;
 - (ld): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n L L L_y D_n L L L_y D_n$;
 - (le): $D L L L D (L L L D)_a$, o
 - (lf): $D L L L D L L L D$, y

- 10 aplicándose el patrón D/L de acuerdo con la fórmula genérica (l) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (la), (lb), (lc), (ld), (le) o (lf) a una de las siguientes secuencias:

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT (1-86)	8	86	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT ACTNCYCKKC CFHCQVCFIT KALGISYGRK KRRQRRRPPQ GSQTHQVSL S KQPTSQSRGD PTGPKE
TAT (37-72)	9	36	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VLSKQ
TAT (37-58)	10	22	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RP
TAT (38-58)GGC	11	24	FITKALGISY GRKKRRQRRR PGGC
TAT CGG(47-58)	12	15	CGGYGRKKRR QRRRP
TAT (47-58)GGC	13	15	YGRKKRRQRR RPPGCG
TAT (1-72) Mut Cys/Ala 72	14	56	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT AFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VLSKQ
L-generic-TAT	15	17	XXXXRKKRRQRRRXXXX (NH ₂ - XXXXRKKRRQRRRXXXX -COOH)
L-generic-TAT (s)	16	11	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -COOH
L-TAT (s1a)	17	10	GRKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
L-TAT (s1b)	18	9	RKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (s1c)	19	11	YDRKKRRQRRR
r ₃ -L-TAT	20	9	rKKRrQRRr
r ₃ -L-TATi	21	9	rRRQrRKKr
βA-r ₃ -L-TAT	22	9	βA-rKKRrQRRr
βA-r ₃ -L-TATi	23	9	βA-rRRQrRKKr
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	24	9	FITC-βA-rKKRrQRRr
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	25	9	FITC-βA-rRRQrRKKr
TAT(s2-1)	26	9	rAKRrQRRr
TAT(s2-2)	27	9	rKARrQRRr
TAT(s2-3)	28	9	rKKAQRRr
TAT(s2-4)	29	9	rKKRrARRr
TAT(s2-5)	30	9	rKKRrQARr
TAT(s2-6)	31	9	rKKRrQARr
TAT(s2-7)	32	9	rDKRrQRRr
TAT(s2-8)	33	9	rKDRrQRRr
TAT(s2-9)	34	9	rKKDrQRRr
TAT(s2-10)	35	9	rKKRrDRRr
TAT(s2-11)	36	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-12)	37	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-13)	38	9	rEKRrQRRr
TAT(s2-14)	39	9	rKERrQRRr
TAT(s2-15)	40	9	rKKErQRRr
TAT(s2-16)	41	9	rKKRrERRr
TAT(s2-17)	42	9	rKKRrQERr
TAT(s2-18)	43	9	rKKRrQERr
TAT(s2-19)	44	9	rFKRrQRRr
TAT(s2-20)	45	9	rKFRrQRRr
TAT(s2-21)	46	9	rKFrQRRr
TAT(s2-22)	47	9	rKKRrFRRr
TAT(s2-23)	48	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-24)	49	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-25)	50	9	rRKRrQRRr
TAT(s2-26)	51	9	rRRRrQRRr
TAT(s2-27)	52	9	rKKKQRRr
TAT(s2-28)	53	9	rKKRrRRRr

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT(s2-29)	54	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-30)	55	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-31)	56	9	rHKRrQRRr
TAT(s2-32)	57	9	rKHRrQRRr
TAT(s2-33)	58	9	rKKhRrQRRr
TAT(s2-34)	59	9	rKKRrHRRr
TAT(s2-35)	60	9	rKKRrQHRr
TAT(s2-36)	61	9	rKKRrQRHr
TAT(s2-37)	62	9	rIKRrQRRr
TAT(s2-38)	63	9	rKIRrQRRr
TAT(s2-39)	64	9	rKKIrQRRr
TAT(s2-40)	65	9	rKKRrIRRr
TAT(s2-41)	66	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-42)	67	9	rKKRrQRlr
TAT(s2-43)	68	9	rLKRrQRRr
TAT(s2-44)	69	9	rKLRrQRRr
TAT(s2-45)	70	9	rKKLrQRRr
TAT(s2-46)	71	9	rKKRrLRRr
TAT(s2-47)	72	9	rKKRrQLRr
TAT(s2-48)	73	9	rKKRrQLr
TAT(s2-49)	74	9	rMKRrQRRr
TAT(s2-50)	75	9	rKMRrQRRr
TAT(s2-51)	76	9	rKMrQRRr
TAT(s2-52)	77	9	rKKRrMRRr
TAT(s2-53)	78	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-54)	79	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-55)	80	9	rNKRrQRRr
TAT(s2-56)	81	9	rKNRrQRRr
TAT(s2-57)	82	9	rKKNrQRRr
TAT(s2-58)	83	9	rKKRrNRRr
TAT(s2-59)	84	9	rKKRrQNRr
TAT(s2-60)	85	9	rKKRrQRNr
TAT(s2-61)	86	9	rQKRrQRRr
TAT(s2-62)	87	9	rKQRrQRRr
TAT(s2-63)	88	9	rKKQrQRRr
TAT(s2-64)	89	9	rKKRrKRRr

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT(s2-65)	90	9	rKKRrQQRr
TAT(s2-66)	91	9	rKKRrQRQr
TAT(s2-67)	92	9	rSKRrQRRr
TAT(s2-68)	93	9	rKSRrQRRr
TAT(s2-69)	94	9	rKKSrQRRr
TAT(s2-70)	95	9	rKKRrSRRr
TAT(s2-71)	96	9	rKKRrQSRr
TAT(s2-72)	97	9	rKKRrQRSr
TAT(s2-73)	98	9	rTKRrQRRr
TAT(s2-74)	99	9	rKTRrQRRr
TAT(s2-75)	100	9	rKKTTrQRRr
TAT(s2-76)	101	9	rKKRrTRRr
TAT(s2-77)	102	9	rKKRrQTRr
TAT(s2-78)	103	9	rKKRrQRTTr
TAT(s2-79)	104	9	rVKRrQRRr
TAT(s2-80)	105	9	rKVRrQRRr
TAT(s2-81)	106	9	rKKVrQRRr
TAT(s2-82)	107	9	rKKRrVRRr
TAT(s2-83)	108	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-84)	109	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-85)	110	9	rWKRrQRRr
TAT(s2-86)	111	9	rKWRrQRRr
TAT(s2-87)	112	9	rKKWrQRRr
TAT(s2-88)	113	9	rKKRrWRRr
TAT(s2-89)	114	9	rKKRrQWRr
TAT(s2-90)	115	9	rKKRrQRWr
TAT(s2-91)	116	9	rYKRrQRRr
TAT(s2-92)	117	9	rKYRrQRRr
TAT(s2-93)	118	9	rKKYrQRRr
TAT(s2-94)	119	9	rKKRrYRRr
TAT(s2-95)	120	9	rKKRrQYRr
TAT(s2-96)	121	9	rKKRrQRYr
r ₃ R ₆	122	9	rRRRrRRRr
L-R ₉	123	9	RRRRRRRRR
L-R ₈	124	8	RRRRRRRR
L-R ₇	125	7	RRRRRRR

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
L-R ₆	126	6	RRRRRR
L-R ₅	127	5	RRRRR
PTD-4	128	11	YARAAARQARA
PTD-4 (variant 1)	129	11	WARAAARQARA
PTD-4 (variant 2)	130	11	WARAQRAAARA
L-P1 Penetratin	131	16	RQVKVWFQNRMMKWKK
D-P1 Penetratin	132	16	KKWKMRRNQFWVKVQR
JNKI, bestfit	133	17	WKRAAARKARAMSLNLF
JNKI, bestfit (variant 1)	134	17	WKRAAARAARAMSLNLF
MDCK transcytose sequence	135	9	RYRGDLGRR
YKGL	136	4	YKGL
r ₃ (generic)	252	9	rXXXrXXXr

- 5 o una secuencia inversa de éstas, o una variante o fragmento de estas secuencias, conservando una variante o fragmento de estas secuencias la función de posibilitar una translocación a través de membranas biológicas y consistiendo en una secuencia peptídica que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% en toda la longitud en relación con la secuencia nativa respectiva.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "constructo transportador" se refiere a un compuesto que contiene aminoácidos que es capaz de una translocación a través de membranas biológicas. Tal como se utiliza aquí, el concepto "secuencia de tráfico" (o "secuencia transportadora") se refiere a una secuencia de aminoácidos que posibilita una translocación a través de membranas biológicas. Por consiguiente, los constructo-transportadores de acuerdo con la presente invención comprenden una secuencia de tráfico que permite una translocación del constructo transportador a través de membranas biológicas. Así, los constructo-transportadores tal como se definen más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) posibilitan eficazmente y pueden proporcionar el transporte de fracciones de carga, por ejemplo de proteínas o péptidos, de ácidos nucleicos, de pequeñas moléculas orgánicas, de agentes citotóxicos, etc. al interior de un organismo, un tejido, una célula (por ejemplo a tratar), un subcompartimento celular y/o al interior del núcleo de una célula.

20 Ventajosamente, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) es lo suficientemente estable para prevenir la degradación por proteasas antes del transporte de la fracción de carga a su lugar de destino. Por otro lado, los constructos transportadores de la invención tal como se definen más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) no persisten permanentemente en la célula y pueden ser degradados por proteasas dentro de un límite de tiempo considerable para evitar efectos secundarios negativos, tales como una acumulación no deseada del nuevo transportador de la invención o su conjugado en la célula. Tal como descubrieron sorprendentemente los inventores, estas propiedades ventajosas pueden ser conferidas a una secuencia de tráfico tal como se describe más arriba únicamente mediante el patrón tal como se describe más arriba (también descrito aquí como patrón D/L) de la fórmula genérica (I) arriba definida, el contenido específico y la posición de los D-aminoácidos en alteración con el contenido específico de L-aminoácidos tal como se define en la fórmula genérica (I). Este patrón D/L tal como se describe aquí permite a un especialista definir la persistencia *in vivo* o *in vitro* del constructo transportador de la invención tal como se define más arriba en la célula con suficiente precisión en un tiempo suficientemente largo para asegurar la administración y la introducción del constructo transportador de la invención tal como se describe más arriba en la célula o el núcleo antes de su degradación tal como se describe más arriba por proteasas dentro de un límite de tiempo considerable. Esta persistencia *in vivo* o *in vitro* del constructo transportador de la invención tal como se define más arriba en la célula depende de hecho del contenido específico y la posición de los D-aminoácidos en alteración con el contenido específico de L-aminoácidos tal como se define en la fórmula genérica (I). Además, un constructo

transportador que presenta el patrón D/L de la fórmula genérica (I) arriba definida es suficientemente corto para evitar un impedimento estérico de una fracción de carga mediante el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba en una molécula conjugada transportador-carga tal como se define más abajo. También permite una preparación rentable de dichos constructos transportadores de la invención tal como se definen más arriba. Adicionalmente, es fácil formar un conjugado del péptido o la proteína transportadores de la fórmula genérica (I) arriba definida con proteínas o péptidos, ácidos nucleicos, tales como moléculas de ADN y ARN, o con agentes citotóxicos o incluso pequeñas moléculas orgánicas, etc.

De acuerdo con la fórmula genérica (I) arriba definida, el constructo transportador de la invención tal como se describe más arriba comprende L-aminoácidos y D-aminoácidos de acuerdo con el patrón D/L específico establecido en la fórmula genérica (I).

En el contexto de la presente invención, los L-aminoácidos, también denominados aminoácidos L-enantioméricos, preferentemente son aminoácidos seleccionados entre aminoácidos nativos o sus derivados. Los aminoácidos nativos se seleccionan normalmente entre los aminoácidos estándar (proteínogénicos) alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutamínico; glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenil alanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina, y también entre aminoácidos no estándar, como ornitina, citrulina, homocisteína, S-adenosil metionina, hidroxiprolina, selenocisteína, pirrolisina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina, ácido gamma-aminobutírico, etc.

Los derivados de estos L-aminoácidos o aminoácidos L-enantioméricos comprenden normalmente cualquier derivado natural o no natural de estos aminoácidos, incluyendo, de forma no exclusiva, aminoácidos tal como se definen más arriba que comprenden modificaciones postraduccionales o modificaciones sintéticas, incluyendo acetilación (en el extremo N de la secuencia de péptidos, en residuos de lisina, etc.), desacetilación, alquilación, como metilación, etilación, etc. (preferentemente en residuos de lisina o arginina dentro de la secuencia de péptidos), desalquilación, como desmetilación, desetilación, etc., amidación (preferentemente en el extremo C de la secuencia de péptidos), formulación, gamma-carboxilación, glutamilación, glicosilación (preferentemente en residuos de asparagina, lisina, hidroxilisina, serina o treonina, etc. dentro de la secuencia de péptidos), adición de una fracción hemo, hidroxilación, yodación, isoprenilación (adición de una fracción isoprenoide tal como farnesilo o geranilgeraniol, etc.), lipoilación (unión de funcionalidad de lipoato), como prenilación, formación de un anclaje GPI, incluyendo miristoilación, farnesilación, geranilgeranilación, etc., oxidación, fosforilación (por ejemplo a una fracción serina, tirosina, treonina o histidina, etc. dentro de la secuencia de péptidos), sulfatación (por ejemplo de tirosina), selenoilación, sulfatación, etc.

Los derivados de L-aminoácidos también incluyen, de forma no exclusiva, L-aminoácidos modificados que han sido modificados mediante la introducción de uno de los siguientes marcadores:

- i. marcadores radiactivos, es decir, fosforilación radiactiva o un marcador radiactivo con azufre, hidrógeno, carbono, nitrógeno, etc.;
- ii. tintes de color (por ejemplo digoxigenina, etc.);
- iii. grupos fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, rodamina, proteínas de fluorocromo tal como se definen más abajo, etc.);
- iv. grupos quimioluminiscentes;
- v. una combinación de dos o más de los marcadores mencionados en los puntos (i) a (iv).

Ejemplos particularmente específicos de derivados de L-aminoácidos incluyen, de forma no exclusiva, AMC (aminometilcumarina), Dabcyl (dimetilaminofenilazobenzóilo), Dansyl (dimetilaminonaftalenosulfonilo), FAM (carboxifluoresceína), Mca (metoxicumarina acetilo), Xan (xantilo), Abu (ácido aminobutírico), Beta-Ala (beta-alanina), E-Ahx (ácido 6-aminoheptanoico), Alpha-Aib (ácido alfa-aminoisobutírico), Ams (aminoserina), Cha (ciclohexilamina), Dab (ácido diaminobutírico), Hse (homoserina), Hyp (hidroxiprolina), Mpr (ácido mercaptopropiónico), Nal (naftilalanina), Nva (norvalina), Orn (ornitina), Phg (fenilglicina), Sar (sarcosina), Sec (selenocisteína), Thi (tienilalanina), etc.

Además, aminoácidos L-enantioméricos seleccionados para el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba se pueden seleccionar adicionalmente entre combinaciones específicas de los aminoácidos L-enantioméricos arriba definidos o derivados de los mismos. Estas combinaciones pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o incluso más de los aminoácidos L-enantioméricos arriba definidos o derivados de los mismos. También son posibles combinaciones entre cualquiera de los aminoácidos L-enantioméricos arriba definidos o derivados de los mismos y cualquiera de los aminoácidos D-enantioméricos arriba definidos o derivados de los mismos dentro de las definiciones de la fórmula genérica (I) o de cualquiera de las subfórmulas tal como se definen aquí. Estas combinaciones específicas de aminoácidos

- pueden tener una estabilidad mayor o menor en relación con las peptidasas y, por tanto, pueden proporcionar otra posibilidad para variar la estabilidad *in vivo* o *in vitro* del constructo transportador de la invención tal como se define más arriba hacia una mayor o una menor estabilidad. Por ejemplo, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba puede contener la secuencia dipeptídica Arg-Lys en forma D y/o L (es decir, como aminoácidos D-enantioméricos o aminoácidos L-enantioméricos, o como aminoácidos mixtos D- y L-enantioméricos), preferentemente en forma L, que tiene una menor estabilidad en relación con las peptidasas y, por tanto, puede utilizarse para desestabilizar la secuencia peptídica del constructo transportador de la invención tal como se define más arriba y, en consecuencia, para reducir adicionalmente su vida media *in vivo*.
- 5
- 10 En el contexto de la presente invención, los D-aminoácidos, también denominados aminoácidos D-enantioméricos, preferentemente son aminoácidos "retroinverso" no nativos (no proteinogénicos), derivándose estos aminoácidos "retroinversos" no nativos (no proteinogénicos) de L-aminoácidos naturales y/o sus derivados tal como se definen más arriba. En este contexto, el término "retroinverso" se refiere a un isómero de un L-aminoácido natural tal como se define más arriba (y péptidos producidos a partir del mismo) donde la quiralidad del residuo L-aminoácido natural está invertida en el D-aminoácido correspondiente (véase Jameson y col., *Nature*, 368,744-746 (1994); Brady y col., *Nature*, 368,692-693 (1994)). Dicho de otro modo, en los enlaces peptídicos de los D-aminoácidos, las posiciones de los grupos carbonilo y amino están intercambiadas, mientras que la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono alfa se conserva. Por consiguiente, los D-aminoácidos se pueden insertar en una secuencia peptídica que comprende o
- 15
- 20 consiste en L-aminoácidos y, por tanto, se pueden conjugar con L-aminoácidos tal como se definen más arriba por métodos conocidos en la técnica. Estos métodos conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, de forma no exclusiva, métodos de síntesis peptídica en fase líquida o métodos de síntesis peptídica en fase sólida, por ejemplo métodos de síntesis peptídica en fase sólida de acuerdo con Merrifield, síntesis peptídica en fase sólida *t*-Boc, síntesis peptídica en fase sólida Fmoc, síntesis peptídica en fase sólida basados en BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio), etc. El contenido de D-aminoácidos de los constructos transportadores de la invención tal como se describen más arriba de acuerdo con el patrón D/L de la fórmula genérica (I) arriba mostrada proporciona además otras diversas propiedades útiles. Por ejemplo, estos nuevos constructos transportadores entran en las células más eficientemente y son más estables (en especial *in vivo*) y muestran una menor inmunogenicidad que los constructos transportadores correspondientes basados en secuencias de L-aminoácidos. Sin embargo, no son tan persistentes en la célula como los constructos transportadores producidos por completo con D-aminoácidos, en particular debido al hecho de que casi todas las enzimas de descomposición, como proteasas o peptidasas, disocian enlaces peptídicos entre L-aminoácidos adyacentes. Por consiguiente, los péptidos compuestos por aminoácidos D-enantioméricos y aminoácidos L-enantioméricos son en gran medida resistentes frente a una rápida disgregación proteolítica, sin conducir a una acumulación en la célula debido a la falta de degradación por proteasas.
- 25
- 30
- 35

El constructo transportador de la invención arriba definido según la fórmula genérica (I) comprende preferentemente L-aminoácidos y D-aminoácidos o sus derivados tal como se definen más arriba. Estos derivados pueden estar incluidos en el constructo transportador completo de la invención tal como se define más arriba en un contenido de aproximadamente un 0%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90%, o incluso aproximadamente un 100%. Dicho de otro modo, el péptido transportador completo de la invención puede contener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o incluso más de estos derivados, evidentemente estando limitada la cantidad máxima de derivados posibles por la cantidad máxima de aminoácidos contenidos en el constructo transportador de la invención arriba definido, tal como se describe más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I).

40

45

De acuerdo con la fórmula genérica (I) arriba definida, el constructo transportador de la invención comprende un patrón D/L específico de L-aminoácidos y D-aminoácidos, que está definido por números enteros "a", "l", "m", "n", "x" e "y".

50

De acuerdo con la definición de la fórmula genérica (I) anterior, "a" es un determinante que define el número de repeticiones del subgrupo (LLL_yD) tal como se define en la fórmula genérica (I) D_lLLL_xD_m(LLL_yD_n)_a. De acuerdo con la definición dada más arriba, "a" puede ser cualquier número seleccionado del intervalo de 0 - 3, preferentemente seleccionado del intervalo de 0 - 2, de forma especialmente preferente del intervalo de 0 - 1, o se puede seleccionar entre los números individuales 0, 1, 2 o 3, de forma incluso más preferente entre los números individuales 0, 1 o 2 y de forma totalmente preferente "a" = 1. De acuerdo con el número específico de repeticiones de a = 0, 1, 2 o 3, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba según la fórmula genérica (I) D_lLLL_xD_m(LLL_yD_n)_a puede comprender o consistir en al menos una de las siguientes subfórmulas (Ia) a (Id):

55

- (la): $D_1 L L L_x D_m$ (SEQ ID N°: 2);
 (lb): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n$ (SEQ ID N°: 3);
 (lc): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n L L L_z D_n$ (SEQ ID N°: 4); o
 (ld): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n L L L_z D_n L L L_w D_n$ (SEQ ID N°: 5).

5 Además, de acuerdo con la definición de la fórmula genérica (I) dada más arriba, "l", "m" y "n" son números enteros que definen el número de D-aminoácidos presentes en la fórmula genérica (I), pero también en las subfórmulas (la) a (ld) tal como se definen aquí. Los números enteros "l", "m" y "n" se pueden seleccionar independientemente entre sí. Esto es particularmente aplicable para el determinante "n", que puede estar presente varias veces en la fórmula genérica (I) o las subfórmulas (la) a (ld) tal como se definen aquí, es decir, si "n" está presente varias veces, cada "n" se puede seleccionar independientemente entre sí. De acuerdo con la definición arriba dada, los números enteros "l", "m" y "n" pueden ser, independientemente entre sí, cualquier número seleccionado del intervalo de 1 - 2, o se pueden seleccionar entre los números individuales 1 o 2, de forma incluso más preferente "l", "m" y/o "n" = 1.

15 Adicionalmente, de acuerdo con la definición de la fórmula genérica (I) anterior, "x" e "y" son números enteros que definen el número de L-aminoácidos presentes en la fórmula genérica (I), pero también en las subfórmulas (la) a (ld) tal como se definen aquí. Los números enteros "x" e "y" se pueden seleccionar independientemente entre sí. De acuerdo con la definición arriba dada, los números enteros "x" e "y" pueden ser, independientemente entre sí, cualquier número seleccionado del intervalo de 0 - 2, preferentemente seleccionado del intervalo de 0 - 1, o se pueden seleccionar entre los números individuales 0, 1 o 2, de forma incluso más preferente entre los números individuales 0 o 1 y de forma totalmente preferente "x" y/o "y" = 1.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, el objeto de la presente invención se resuelve mediante un nuevo constructo transportador que comprende o consiste en al menos una secuencia de la subfórmula específica (le):

DLLLD(LLLD)_a (SEQ ID N°: 6);

25 donde D, L y "a" son tal como se define más arriba en relación con la fórmula genérica (I) o las subfórmulas (la) a (ld).

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el objeto de la presente invención se resuelve mediante un constructo transportador tal como se define más arriba que comprende o consiste en al menos una secuencia de la subfórmula específica (lf):

30 **DLLLLLLLL (SEQ ID N°: 7);**

donde D y L son tal como se define más arriba en relación con la fórmula genérica (I) o las subfórmulas (la) a (ld).

El constructo transportador de la invención tal como se describe más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I), en particular de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (la), (lb), (lc), (ld), (le) o (lf), en particular constructo transportadores que comprenden el patrón D/L tal como se describe aquí, se aplica a cualquier secuencia de tráfico de la Tabla 1, tal como se describe más arriba, estando determinada el número seleccionado de aminoácidos contiguos de estas secuencias de tráfico por el número de aminoácidos tal como se define mediante la fórmula genérica (I) o cualquiera de las subfórmulas (la), (lb), (lc), (ld), (le) o (lf). Las secuencias de tráfico normalmente dirigen el transporte de una fracción de carga al interior de una célula o del núcleo o a otra región diana específica y pueden comprender, de forma no exclusiva, proteínas de translocación tal como se definen más arriba, por ejemplo derivadas de VIH TAT (VIH), por ejemplo proteínas nativas como, por ejemplo, proteína TAT (por ejemplo tal como se describe en las Patentes U.S. n° 5.804.604 y 5.674.980, ambas incorporadas aquí por referencia), por ejemplo de derivadas de VIH tat (VIH), VHS VP22 (*Herpes simplex*) (descrito por ejemplo en el documento WO 97/05265; Elliott y O'Hare, Cell 88 : 223-233 (1997)), proteínas no virales (Jackson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10691-10695 (1992)), secuencias de tráfico derivadas de Antennapedia, en particular de *Drosophila antennapedia* (por ejemplo, la secuencia portadora de antennapedia de las mismas), FGF, lactoferrina, etc., o derivadas de péptidos básicos, por ejemplo péptidos con una longitud de 5 a 15 aminoácidos, preferentemente de 10 a 12 aminoácidos, y que comprenden al menos un 80%, de forma especialmente preferente un 85% o incluso un 90% de aminoácidos básicos, tales como arginina, lisina y/o histidina, o se pueden seleccionar entre secuencias de péptidos ricas en arginina, como R₉, R₈, R₇, R₆, R₅, etc., entre VP22, entre proteínas o péptidos derivados de PTD-4, entre RGD-K₁₆, entre proteínas o péptidos derivados de PEPT1/2 o PEPT1/2, entre proteínas o péptidos derivados de SynB3 o SynB3, entre inhibidores de PC, entre proteínas o péptidos derivados de P21, o entre proteínas o péptidos derivados de JNKI. Además, aquí también se dan a conocer

conjuntamente variantes, fragmentos y derivados de una de las proteínas nativas utilizadas como secuencias de tráfico.

Ejemplos particulares de secuencias de tráfico que forman una base para el constructo transportador como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If), tal como se definen más arriba, se pueden seleccionar, de forma no exclusiva, de entre una llamada secuencia de permeabilidad celular TAT, mostrada en la Tabla 1, que se deriva de la secuencia de tráfico básica de la proteína VIH-1 TAT. Preferentemente, la secuencia de tráfico básica de la proteína VIH-1 TAT puede incluir secuencias de la proteína VIH-1 TAT del virus de la inmunodeficiencia humana, por ejemplo tal como se describe en las Patentes U.S. nº 5.804.604 y 5.674.980. En este contexto, la proteína VIH-1 TAT de longitud completa tiene 86 residuos aminoácidos [SEQ ID N°: 8] codificada por dos exones del gen VIH TAT. Los aminoácidos TAT 1-72 están codificados por el exón 1, mientras que los aminoácidos 73-86 están codificados por el exón 2. La proteína TAT de longitud completa se caracteriza por una región básica que contiene dos lisinas y seis argininas (aminoácidos 49-57) y una región rica en cisteína que contiene siete residuos cisteína (aminoácidos 22-37). La región básica (es decir, los aminoácidos 49-57) se consideró importante para la localización nuclear (Ruben, S. y col., J. Virol. 63: 1-8 (1989); Hauber, J. y col., J. Virol. 63 1181-1187 (1989)). La región rica en cisteína media en la formación de dímeros unidos con metales *in vitro* (Frankel, A. D. y col., Science 240: 70-73 (1988); Frankel, A. D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 6297-6300 (1988)) y es esencial para su actividad como transactivador (Garcia, J. A. y col., EMBO J. 7: 3143 (1988); Sadaie, M. R. y col., J. Virol. 63:1 (1989)). Como en otras proteínas reguladoras, la región N-terminal puede intervenir en la protección contra proteasas intracelulares (Bachmair, A. y col., Cell 56: 1019-1032 (1989)). Secuencias de tráfico TAT preferentes utilizadas con la fórmula genérica (I) o cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) se caracterizan preferentemente por la presencia de la secuencia de aminoácidos de la región básica de TAT (aminoácidos 49-57 de la proteína tat natural); la ausencia de la secuencia de aminoácidos de la región rica en cisteína de TAT (aminoácidos 22-36 de la proteína TAT natural) y la ausencia del dominio carboxi-terminal codificado por el exón 2 de TAT (aminoácidos 73-86 de la proteína TAT natural).

De acuerdo con una realización especialmente preferente, las secuencias de tráfico que forman una base para el constructo transportador como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If), tal como se definen más arriba, se pueden seleccionar entre una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1 que contiene residuos de TAT 48 - 57 o 49 a 57, y de forma especialmente preferente una secuencia de TAT según cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 14, o entre una secuencia de TAT genérica $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RKKRRQRRR-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-TAT-genérica (s)) [SEQ ID N°: 16] y/o $\text{XXXXRKKRRR RRRXXXX}$ (L-TAT-genérica) [SEQ ID N°: 15]. En este contexto, cada X representa típicamente un residuo aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquiera de los residuos aminoácidos (naturales) aquí definidos. Además, cada X_n^b se puede seleccionar entre cualquiera de los residuos aminoácidos aquí definidos, siendo n (el número de repeticiones de X) 0 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 20 - 30 o más. Preferentemente, X_n^b representa un tramo contiguo de residuos de péptido derivados de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID N°: 8 (TAT (1 - 86)). Alternativamente, las secuencias de tráfico que forman una base para el constructo transportador como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If), tal como se definen más arriba, se pueden seleccionar por ejemplo entre un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQRRR-COOH}$ (L-TAT (s1a)) [SEQ ID N°: 17] o la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-RKKRRQRRR-COOH}$ (L-TAT (s1b)) [SEQ ID N°: 18].

El experto entenderá que frases tales como "un patrón D/L de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If)" se pueden utilizar con una secuencia (de tráfico) particular o aplicar a la misma, o "pueden formar una base para un constructo de péptidos transportador de acuerdo con la fórmula genérica (I) o con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If)", etc. están concebidas para ilustrar que se reivindica una secuencia que presenta determinadas características en relación con:

- i. la secuencia de residuos de cadena lateral que caracterizan entidades de aminoácidos específicas, y
- ii. a secuencia de D- y L-aminoácidos en dicha secuencia.

Como ejemplo ilustrativo: si se utiliza la fórmula (If) o se aplica a TAT (1 - 86) (SEQ ID N°: 8), la secuencia de los residuos de cadena lateral (i) es tal como se indica en la SEQ ID N°: 8. Sin embargo, esta secuencia reivindicada no es una secuencia de L-aminoácidos pura, sino que comprende en algún lugar el motivo de la subfórmula (If). Un ejemplo de una realización de este tipo sería la siguiente secuencia (D-aminoácidos indicados en letras minúsculas y L-aminoácidos indicados en letras mayúsculas):

MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT ACTNCYCKKC CFHCQVCFIT KALGISYGrK KRrQRRrPPQ
GSQTHQVSLs KQPTSQSRGD PTGPKE.

Dado que la SEQ ID N°: 8 comprende 86 aminoácidos, evidentemente existen otras diversas posibilidades de emplazamiento del motivo de la subfórmula (If) en algún lugar de esta secuencia. También está previsto que, en realizaciones particulares, la secuencia pueda comprender más de un motivo de la fórmula genérica y/o las subfórmulas.

- 5 Las secuencias de tráfico que forman una base para el constructo peptídico transportador de acuerdo con la fórmula genérica (I) o con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If), tal como se definen más arriba, se seleccionan entre secuencias o una parte de éstas tal como se definen en la siguiente Tabla 1, o cualquier fragmento, variante o derivado de las mismas (siempre que mantenga la función de translocación a través de una membrana biológica).

10

Tabla 1

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT (1-86)	8	86	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT ACTNCYCKKC CFHCQVCFIT KALGISYGRK KRRQRRRPPQ GSQTHQVSLK KQPTSQSRGD PTGPKE
TAT (37-72)	9	36	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VSLSKQ
TAT (37-58)	10	22	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RP
TAT (38-58)GGC	11	24	FITKALGISY GRKKRRQRRR PGGC
TAT CGG(47-58)	12	15	CGGYGRKKRR QRRRP
TAT (47-58)GGC	13	15	YGRKKRRQRR RPPGGC
TAT (1-72) Mut Cys/Ala 72	14	56	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT AFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VSLSKQ
L-generic-TAT	15	17	XXXXRKKRRQRRRXXXX (NH ₂ -XXXXRKKRRQRRRXXXX-COOH)
L-generic-TAT (s)	16	11	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -COOH
L-TAT (s1a)	17	10	GRKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (s1b)	18	9	RKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (s1c)	19	11	YDRKKRRQRRR
r ₃ -L-TAT	20	9	rKKRrQRRr
r ₃ -L-TATi	21	9	rRRQrRKKr
βA-r ₃ -L-TAT	22	9	βA-rKKRrQRRr
βA-r ₃ -L-TATi	23	9	βA-rRRQrRKKr
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	24	9	FITC-βA-rKKRrQRRr

15

20

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	25	9	FITC-βA-rRRQrRKKr
TAT(s2-1)	26	9	rAKRrQRRr
TAT(s2-2)	27	9	rKARrQRRr
TAT(s2-3)	28	9	rKKAQRRr
TAT(s2-4)	29	9	rKKRrARRr
TAT(s2-5)	30	9	rKKRrQARr
TAT(s2-6)	31	9	rKKRrQARr
TAT(s2-7)	32	9	rDKRrQRRr
TAT(s2-8)	33	9	rKDRrQRRr
TAT(s2-9)	34	9	rKKDrQRRr
TAT(s2-10)	35	9	rKKRrDRRr
TAT(s2-11)	36	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-12)	37	9	rKKRrQRDr
TAT(s2-13)	38	9	rEKRrQRRr
TAT(s2-14)	39	9	rKERrQRRr
TAT(s2-15)	40	9	rKKErQRRr
TAT(s2-16)	41	9	rKKRrERRr
TAT(s2-17)	42	9	rKKRrQERr
TAT(s2-18)	43	9	rKKRrQERr
TAT(s2-19)	44	9	rFKRrQRRr
TAT(s2-20)	45	9	rKFRrQRRr
TAT(s2-21)	46	9	rKKFrQRRr
TAT(s2-22)	47	9	rKKRrFRRr
TAT(s2-23)	48	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-24)	49	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-25)	50	9	rRKRrQRRr
TAT(s2-26)	51	9	rRRRrQRRr
TAT(s2-27)	52	9	rKKKQRRr
TAT(s2-28)	53	9	rKKRrRRRr
TAT(s2-29)	54	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-30)	55	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-31)	56	9	rHKRrQRRr
TAT(s2-32)	57	9	rKHRrQRRr
TAT(s2-33)	58	9	rKKhQRRr
TAT(s2-34)	59	9	rKKRrHRRr
TAT(s2-35)	60	9	rKKRrQHRr

ES 2 602 785 T3

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT(s2-36)	61	9	rKKRrQRHr
TAT(s2-37)	62	9	rIKRrQRRr
TAT(s2-38)	63	9	rKIRrQRRr
TAT(s2-39)	64	9	rKKIrQRRr
TAT(s2-40)	65	9	rKKRrIRRr
TAT(s2-41)	66	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-42)	67	9	rKKRrQRlr
TAT(s2-43)	68	9	rLKRrQRRr
TAT(s2-44)	69	9	rKLRrQRRr
TAT(s2-45)	70	9	rKKLrQRRr
TAT(s2-46)	71	9	rKKRrLRRr
TAT(s2-47)	72	9	rKKRrQLRr
TAT(s2-48)	73	9	rKKRrQRLr
TAT(s2-49)	74	9	rMKRrQRRr
TAT(s2-50)	75	9	rKMRrQRRr
TAT(s2-51)	76	9	rKMrQRRr
TAT(s2-52)	77	9	rKKRrMRRr
TAT(s2-53)	78	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-54)	79	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-55)	80	9	rNKRrQRRr
TAT(s2-56)	81	9	rKNRrQRRr
TAT(s2-57)	82	9	rKKNrQRRr
TAT(s2-58)	83	9	rKKRrNRRr
TAT(s2-59)	84	9	rKKRrQNRr
TAT(s2-60)	85	9	rKKRrQRNr
TAT(s2-61)	86	9	rQKRrQRRr
TAT(s2-62)	87	9	rQQRrQRRr
TAT(s2-63)	88	9	rKKQrQRRr
TAT(s2-64)	89	9	rKKRrKRRr
TAT(s2-65)	90	9	rKKRrQQRr
TAT(s2-66)	91	9	rKKRrQRQr
TAT(s2-67)	92	9	rSKRrQRRr
TAT(s2-68)	93	9	rKSRrQRRr
TAT(s2-69)	94	9	rKKSrQRRr
TAT(s2-70)	95	9	rKKRrSRRr
TAT(s2-71)	96	9	rKKRrQSRr

ES 2 602 785 T3

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT(s2-72)	97	9	rKKRrQRSr
TAT(s2-73)	98	9	rTKRrQRRr
TAT(s2-74)	99	9	rKTRrQRRr
TAT(s2-75)	100	9	rKkTrQRRr
TAT(s2-76)	101	9	rKKRrTRRr
TAT(s2-77)	102	9	rKKRrQTRr
TAT(s2-78)	103	9	rKKRrQRTTr
TAT(s2-79)	104	9	rVKRrQRRr
TAT(s2-80)	105	9	rKVRrQRRr
TAT(s2-81)	106	9	rKKVrQRRr
TAT(s2-82)	107	9	rKKRrVRRr
TAT(s2-83)	108	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-84)	109	9	rKKRrQRVr
TAT(s2-85)	110	9	rWKRrQRRr
TAT(s2-86)	111	9	rKWRrQRRr
TAT(s2-87)	112	9	rKKWrQRRr
TAT(s2-88)	113	9	rKKRrWRRr
TAT(s2-89)	114	9	rKKRrQWRr
TAT(s2-90)	115	9	rKKRrQRWr
TAT(s2-91)	116	9	rYKRrQRRr
TAT(s2-92)	117	9	rKYRrQRRr
TAT(s2-93)	118	9	rKkYrQRRr
TAT(s2-94)	119	9	rKKRrYRRr
TAT(s2-95)	120	9	rKKRrQYRr
TAT(s2-96)	121	9	rKKRrQRYr
r ₃ R ⁶	122	9	rRRRrRRRr
L-R ₉	123	9	RRRRRRRR
L-R ₈	124	8	RRRRRRRR
L-R ₇	125	7	RRRRRRR
L-R ₆	126	6	RRRRRR
L-R ₅	127	5	RRRRR
PTD-4	128	11	YARAAARQARA
PTD-4 (variant 1)	129	11	WARAAARQARA
PTD-4 (variant 2)	130	11	WARAQRAAARA
L-P1 Penetratin	131	16	RQVKVWFQNRMMKWKK
D-P1 Penetratin	132	16	KKWKMRRNQFWVKVQR

(continuación)

NOMBRE DE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
JNKI, bestfit	133	17	WKRAAARKARAMSLNLF
JNKI, bestfit (variant 1)	134	17	WKRAAARAARAMSLNLF
MDCK transcytose sequence	135	9	RYRGDLGRR
YKGL	136	4	YKGL
r3 (generic)	252	9	rXXXrXXXr

5 Ejemplos particulares de secuencias de tráfico que forman una base para un constructo transportador de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie), o (If), tal como se definen más arriba, también se pueden seleccionar entre secuencias como las mostradas en la Tabla 1 que tienen la secuencia inversa de esta secuencia específica, es decir, donde el orden de aminoácidos en la secuencia desde el extremo N hasta el extremo C está invertido.

10 Ejemplos particularmente preferentes de secuencias de tráfico que forman una base para un constructo transportador tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se definen más arriba, se pueden seleccionar entre fragmentos o variantes de las secuencias arriba indicadas (con la condición de que dichos fragmentos o variantes conserven la función de posibilitar la translocación a través de membranas biológicas). En este contexto específico, las variantes y/o fragmentos de estas secuencias de tráfico preferentemente comprenden o consisten en una secuencia de péptidos que tiene al menos un 80% o un 15 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% de la longitud de la secuencia nativa de dicha secuencia de tráfico tal como se define más arriba. Adicionalmente, un fragmento de una secuencia de tráfico de este tipo también puede comprender epítomos (también denominados "determinantes antigénicos") de la secuencia de tráfico de longitud completa. Los epítomos en el contexto de la presente invención son normalmente fragmentos 20 situados sobre la superficie exterior de una secuencia de proteínas o péptidos (nativa) tal como se define aquí, que preferentemente tienen de 5 a 15 aminoácidos, de forma especialmente preferente de 5 a 12 aminoácidos, de forma incluso más preferente de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos, es decir, en su forma nativa.

25 En este contexto específico, un "fragmento" de una secuencia de tráfico tal como se define más arriba, en particular en la Tabla 1 o 3, se debe entender preferentemente como una secuencia truncada de la misma, es decir una secuencia de aminoácidos que está truncada en el extremo N, en el extremo C y/o dentro de la secuencia en comparación con la secuencia de aminoácidos nativa.

30 Además, en el contexto específico de la presente invención, una "variante" de una secuencia de tráfico o un fragmento de la misma tal como se define más arriba, en particular tal como se define en la Tabla 1 o 3, se debe entender preferentemente como una secuencia donde la secuencia de aminoácidos de la variante se diferencia de la secuencia de tráfico nativa o de un fragmento de la misma tal como se definen aquí en una o más mutaciones, como uno o más aminoácidos sustituidos (o en caso necesario insertados y/o eliminados por delección). Preferentemente, las variantes de esta secuencia de tráfico tal como se definen más arriba 35 tienen la misma función biológica o actividad específica que la secuencia nativa de longitud completa, es decir, el transporte al interior de células y el núcleo. De forma especialmente preferente, una variante de una secuencia de tráfico de este tipo tal como se define más arriba puede comprender aproximadamente 1 a 50, 1 a 20, de forma incluso más preferente 1 a 10 y de forma totalmente preferente 1 a 5, 4, 3, 2, o 1 alteraciones de aminoácidos dentro del significado arriba indicado. Las variantes de una secuencia de tráfico de este tipo tal como se definen más arriba también pueden comprender sustituciones de aminoácidos 40 conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden incluir residuos aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tienen propiedades físico-químicas suficientemente similares como para que una sustitución entre miembros del grupo conserve la actividad biológica de la molécula (véase, por ejemplo, Grantham, R. (1974), *Science* 185, 862-864). Para los especialistas será evidente que también se pueden insertar y/o someter a delección aminoácidos en las secuencias arriba definidas sin alterar su función, 45 en particular si las inserciones y/o delecciones solo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de veinte, preferentemente menos de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos críticos para la actividad funcional. En particular, las sustituciones de aminoácidos conservativas preferentemente son sustituciones donde los aminoácidos que proceden de la misma clase de aminoácidos (aminoácidos básicos, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, etc.) se intercambian entre sí. En particular se trata de aminoácidos, cadenas

laterales alifáticas, cadenas laterales con carga positiva o negativa, grupos aromáticos en las cadenas laterales de aminoácidos, cuyas cadenas laterales pueden entrar en puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales que tienen una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido que tiene una cadena lateral polar es sustituido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral también polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba es sustituido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral también hidrófoba (por ejemplo serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Preferentemente, los residuos aminoácidos sinónimos, que se clasifican en los mismos grupos y son normalmente intercambiables mediante sustituciones de aminoácidos conservativas, se definen en la Tabla 2.

10 **Tabla 2**
Grupos Preferentes de Grupos de Residuos Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Residuos Sinónimos
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, (Thr), Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, (Thr), Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, (Thr), Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

15 En una realización particular, la longitud de una secuencia de tráfico utilizada para un constructo transportador tal como se define más arriba, es decir, el número de aminoácidos contiguos seleccionados entre cualquiera de las secuencias de tráfico arriba definidas, se puede determinar por el número de aminoácidos de fórmula genérica (I) o por cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) tal como se definen más arriba. Por consiguiente, la longitud (de secuencia) de un constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) se puede desviar de la longitud de las secuencias de tráfico aquí mostradas, por ejemplo en la Tabla 1 o 3. Dicho de otro modo, la longitud del constructo transportador tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se definen más arriba, puede determinar la longitud de la secuencia de aminoácidos, tomada de una secuencia de tráfico tal como se define aquí, siempre que la secuencia de aminoácidos se tome de un tramo contiguo de aminoácidos de dicha secuencia de tráfico. Por ejemplo, si la longitud de un constructo transportador tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se definen más arriba, es de 9 aminoácidos, una secuencia adecuada de un constructo transportador se deriva de 9 aminoácidos contiguos de una secuencia de tráfico tal como se define más arriba, pudiendo derivarse la secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquier posición o región de dicha secuencia de tráfico. Lo mismo es aplicable a cualquier otra longitud determinada por la fórmula genérica (I) o por cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se definen más arriba. También está previsto que, en algunas realizaciones, la secuencia de tráfico del constructo transportador de acuerdo con la presente invención tenga menos de 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, y/o menos de 10 aminoácidos de longitud.

35 De acuerdo con otra realización preferente, un constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) comprende o consiste en al menos una variante y/o un fragmento de las secuencias arriba definidas. Estas variantes y/o fragmentos mantienen la actividad biológica de los constructos transportadores de la invención tal como se definen más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con

5 cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se dan a conocer más arriba. La funcionalidad de estos fragmentos o variantes se puede analizar mediante diversas pruebas, por ejemplo eficacia de transfección, expresión correcta de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de carga, o mediante métodos biofísicos, por ejemplo espectroscopía, modelización por ordenador, análisis estructural, etc. En particular, los constructos transportadores de la invención tal como se describen más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se dan a conocer más arriba, o variantes y/o fragmentos de las mismas, se pueden analizar mediante análisis del carácter hidrófilo (véase, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3824-3828), que puede emplearse para identificar las regiones hidrófobas e hidrófilas de los péptidos, ayudando así en el diseño de sustratos para la manipulación experimental. También se puede llevar a cabo un análisis estructural secundario para identificar regiones del constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If), tal como se dan a conocer más arriba, o de variantes y/o fragmentos del mismo, que adoptan motivos estructurales específicos (véase, por ejemplo, Chou y Fasman, 1974, Biochem 13: 222-223). Las operaciones de manipulación, traducción, predicción de estructura secundaria, perfiles de carácter hidrófilo e hidrófobo, predicción y representación gráfica de marcos de lectura abiertos y la determinación de homologías de secuencia se pueden llevar a cabo utilizando programas *software* de ordenador disponibles en la técnica. También se pueden utilizar otros métodos de análisis estructural, incluyendo, por ejemplo, cristalografía de rayos X (véase, por ejemplo, Engstrom, 1974. Biochem Exp Biol 11:7-13), espectroscopía de masas y cromatografía de gas (véase, por ejemplo, METHODS IN PROTEIN SCIENCE, 1997, J. Wiley and Sons, New York, NY) y modelización por ordenador (véase, por ejemplo, Fletterick y Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, En: CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

25 Del mismo modo, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas comprende o consiste en al menos una variante (y/o fragmento) de los constructostransportadores arriba definidos. En el contexto de la invención, las variantes (y/o fragmentos) de estos constructostransportadores tal como se describen más arriba pueden tener una identidad de secuencia con su constructo transportador nativo tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) de al menos un 80% u 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% de toda la longitud del constructo transportador nativo tal como se define más arriba.

35 Un "fragmento" de un constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas se debe entender preferentemente como una secuencia truncada del mismo, es decir, una secuencia de aminoácidos del constructo transportador que está truncada en el extremo N, en el extremo C y/o dentro de la secuencia en comparación con la secuencia de aminoácidos nativa, por ejemplo el constructo transportador nativo de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas.

45 Una "variante" de un constructo transportador de la invención tal como se describe más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas comprende preferentemente una secuencia donde la secuencia de aminoácidos de la variante del constructo transportador se diferencia de la secuencia nativa del constructo transportador tal como se define aquí en una o más mutaciones, como uno o más aminoácidos sustituidos (o en caso necesario insertados y/o eliminados por delección). Preferentemente, las variantes de estos constructos transportadores de la invención tienen la misma función biológica o actividad que los constructos transportadores nativos de la invención de longitud completa tal como se definen más arriba. Preferentemente, una variante de los constructos transportadores de la invención puede comprender aproximadamente 1 a 50, 1 a 20, preferentemente 1 a 10 y de forma especialmente preferente 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 alteraciones de aminoácidos en el sentido arriba indicado. Estas alteraciones pueden comprender, entre otras, modificaciones de aminoácidos tal como se definen más arriba, introducción de marcadores en aminoácidos tal como se definen más arriba, sustitución de un aminoácido por cualquiera de los aminoácidos (modificados o marcados aquí mencionados, delecciones o inserciones de aminoácidos. Además, las variantes tal como se definen aquí preferentemente comprenden sustituciones de aminoácidos conservativas, preferiblemente tal como se ya han definido más arriba.

60 Para determinar el porcentaje en el que dos secuencias de aminoácidos son idénticas, en particular la secuencia de aminoácidos de un constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o

(If) arriba mostradas, o de cualquier otra secuencia de aminoácidos tal como se definen aquí, las secuencias de aminoácidos se pueden alinear para posteriormente compararlas entre sí. Por tanto, por ejemplo se pueden insertar espacios en la secuencia de la primera secuencia de aminoácidos y se puede comparar el componente en la posición correspondiente de la segunda secuencia de aminoácidos. Si una posición en la primera secuencia de aminoácidos está ocupada por el mismo componente como ocurre en una posición en la segunda secuencia de aminoácidos, las dos secuencias son idénticas en esa posición. El porcentaje en el que dos secuencias son idénticas es una función del número de posiciones idénticas dividida entre el número total de posiciones. Evidentemente, lo mismo es aplicable en consecuencia a secuencias de ácidos nucleicos. En el contexto arriba indicado, una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia "que comparte una identidad de secuencia" por ejemplo de al menos un 95% con una secuencia de aminoácidos determinada de la presente invención, significa que la secuencia de la secuencia de aminoácidos en cuestión es idéntica a la secuencia determinada en que la secuencia de aminoácidos en cuestión puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos citada. Dicho de otro modo, para obtener una secuencia de aminoácidos que tenga una secuencia con una identidad de al menos un 95% con respecto a una secuencia de aminoácidos determinada, hasta un 5% (5 de 100) de los residuos aminoácidos de la secuencia en cuestión se pueden insertar o sustituir por otro aminoácido o se puede someter a delección, preferentemente dentro de las definiciones arriba dadas de variantes o fragmentos. Evidentemente, lo mismo es aplicable de modo similar a las secuencias de ácidos nucleicos.

En caso de secuencias (de aminoácidos o ácidos nucleicos) sin una correspondencia exacta es posible determinar un "% de identidad" de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia. En general, estas dos secuencias a comparar se alinean para obtener una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "espacios" en cualquiera de las dos secuencias o en ambas, con el fin de aumentar el grado de alineación. Es posible determinar un % de identidad a todo lo largo de cada una de las secuencias comparadas (denominada alineación global), que es particularmente adecuado para secuencias de longitud igual o similar, o a lo largo de longitudes definidas más cortas (denominada alineación local), que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas se puede determinar, por ejemplo, utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, pero no exclusivo, de un algoritmo matemático que puede emplearse es el algoritmo de Karlin y col. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo está integrado en la familia BLAST de programas, por ejemplo el programa BLAST o NBLAST (véase también Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410 o Altschul y col. (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402), accesible a través de la página principal del NCBI en el sitio web ncbi.nlm.nih.gov y FASTA (Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63-98; Pearson y Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85, 2444-2448.). Estos programas permiten identificar secuencias que son idénticas a otras secuencias en cierta medida. Además, para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos se pueden utilizar programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux y col., 1984, Nucleic Acids Res., 387-395), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP. El programa BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de (Smith y Waterman (1981), J. Mol. Biol. 147, 195-197) y detecta la mejor región simple de similitud entre dos secuencias.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba comprende la subfórmula (If) DLLLDLLLD (SEQ ID N°: 7) tal como se define más arriba, seleccionándose la secuencia transportadora entre cualquiera de las secuencias (específicas) arriba mencionadas, de forma incluso más preferente entre las siguientes secuencias:

50

55

Tabla 3

NOMBRE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
r ₃ -L-TAT	20	9	rKKRrQRRr
r ₃ -L-TATi	21	9	rRRQrRKKr
βA-r ₃ -L-TAT	22	9	βA-rKKRrQRRr
βA-r ₃ -L-TATi	23	9	βA-rRRQrRKKr
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	24	9	FITC-βA-rKKRrQRRr
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	25	9	FITC-βA-rRRQrRKKr
TAT(s2-1)	26	9	rAKRrQRRr
TAT(s2-2)	27	9	rKARrQRRr
TAT(s2-3)	28	9	rKKArQRRr
TAT(s2-4)	29	9	rKKRrARRr
TAT(s2-5)	30	9	rKKRrQARr
TAT(s2-6)	31	9	rKKRrQARr
TAT(s2-7)	32	9	rDKRrQRRr
TAT(s2-8)	33	9	rKDRrQRRr
TAT(s2-9)	34	9	rKKDrQRRr
TAT(s2-10)	35	9	rKKRrDRRr
TAT(s2-11)	36	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-12)	37	9	rKKRrORDr
TAT(s2-13)	38	9	rEKRrQRRr
TAT(s2-14)	39	9	rKERrQRRr
TAT(s2-15)	40	9	rKKErQRRr
TAT(s2-16)	41	9	rKKRrERRr
TAT(s2-17)	42	9	rKKRrQERr
TAT(s2-18)	43	9	rKKRrQERr
TAT(s2-19)	44	9	rFKRrQRRr
TAT(s2-20)	45	9	rKFRrQRRr
TAT(s2-21)	46	9	rKKFrQRRr
TAT(s2-22)	47	9	rKKRrFRRr

ES 2 602 785 T3

NOMBRE SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT(s2-23)	46	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-24)	49	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-25)	50	9	rKKRrQRRr
TAT(s2-26)	51	9	rKKRrQRRr
TAT(s2-27)	52	9	rKKRrQRRr
TAT(s2-28)	53	9	rKKRrRRRr
TAT(s2-29)	54	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-30)	55	9	rKKRrQRKr
TAT(s2-31)	56	9	rHKRrQRRr
TAT(s2-32)	57	9	rKHRrQRRr
TAT(s2-33)	58	9	rKKHrQRRr
TAT(s2-34)	59	9	rKKRrHRRr
TAT(s2-35)	60	9	rKKRrQHRr
TAT(s2-36)	61	9	rKKRrQRHr
TAT(s2-37)	62	9	rIKRrQRRr
TAT(s2-38)	63	9	rKIRrQRRr
TAT(s2-39)	64	9	rKKIrQRRr
TAT(s2-40)	65	9	rKKRrIRRr
TAT(s2-41)	66	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-42)	67	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-43)	68	9	rLKRrQRRr
TAT(s2-44)	69	9	rKLRrQRRr
TAT(s2-45)	70	9	rKKLrQRRr
TAT(s2-46)	71	9	rKKRrLRRr
TAT(s2-47)	72	9	rKKRrQLRr
TAT(s2-48)	73	9	rKKRrQLr
TAT(s2-49)	74	9	rMKRrQRRr
TAT(s2-50)	75	9	rKMRrQRRr
TAT(s2-51)	76	9	rKKMrQRRr
TAT(s2-52)	77	9	rKKRrMRRr
TAT(s2-53)	78	9	rKKRrQMRr

ES 2 602 785 T3

TAT(s2-54)	79	9	rKKRrQRMr
TAT(s2-55)	80	9	rNKRrQRRr
TAT(s2-56)	81	9	rKNRrQRRr
TAT(s2-57)	82	9	rKKNrQRRr
TAT(s2-58)	83	9	rKKRrNRRr
TAT(s2-59)	84	9	rKKRrQNRr
TAT(s2-60)	85	9	rKKRrQRNr
TAT(s2-61)	86	9	rQKRrQRRr
TAT(s2-62)	87	9	rKQRrQRRr
TAT(s2-63)	88	9	rKKQrQRRr
TAT(s2-64)	89	9	rKKRrKRRr
TAT(s2-65)	90	9	rKKRrQQRr
TAT(s2-66)	91	9	rKKRrQRQr
TAT(s2-67)	92	9	rSKRrQRRr
TAT(s2-68)	93	9	rKSRrQRRr
TAT(s2-69)	94	9	rKKSrQRRr
TAT(s2-70)	95	9	rKKRrSRRr
TAT(s2-71)	96	9	rKKRrQSRr
TAT(s2-72)	97	9	rKKRrQRSr
TAT(s2-73)	98	9	rTKRrQRRr
TAT(s2-74)	99	9	rKTRrQRRr
TAT(s2-75)	100	9	rKKTTrQRRr
TAT(s2-76)	101	9	rKKRrTRRr
TAT(s2-77)	102	9	rKKRrQTRr
TAT(s2-78)	103	9	rKKRrQRTr
TAT(s2-79)	104	9	rVKRrQRRr

TAT(s2-80)	105	9	rKVRrQRRr
TAT(s2-81)	106	9	rKKVrQRRr
TAT(s2-82)	107	9	rKKRrVRRr
TAT(s2-83)	108	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-84)	109	9	rKKRrQRVr
TAT(s2-85)	110	9	rWKRrQRRr
TAT(s2-86)	111	9	rKWRrQRRr
TAT(s2-87)	112	9	rKKWrQRRr
TAT(s2-88)	113	9	rKKRrWRRr
TAT(s2-89)	114	9.	rKKRrQWRr
TAT(s2-90)	115	9	rKKRrQRWr
TAT(s2-91)	116	9	rYKRrQRRr
TAT(s2-92)	117	9	rKYRrQRRr
TAT(s2-93)	118	9	rKKYrQRRr
TAT(s2-94)	119	9	rKKRrYRRr
TAT(s2-95)	120	9	rKKRrQYRr
TAT(s2-96)	121	9	rKKRrQRYr
r ₃ R ₆	122	9	rRRRrRRRr
L-R ₉	123	9	RRRRRRRRR

En la tabla arriba mostrada, la subfórmula (If) DLLLDDLLD (SEQ ID N°: 7) se aplica a las secuencias específicas arriba indicadas, es decir, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba comprende 9 aminoácidos, estando indicados los aminoácidos D-enantioméricos con una letra minúscula y los aminoácidos L-enantioméricos con una letra mayúscula.

En una realización particular, el constructo transportador de la invención comprende o consiste en al menos una secuencia de acuerdo con rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252), en la que:

r representa una arginina D-enantiomérica;
X es cualquier L-aminoácido;

10 y donde cada X se puede seleccionar individual e independientemente de cualquier otra X dentro de la SEQ ID N°: 252. Preferentemente, al menos 4 de dichos 6 X L-aminoácidos dentro de la SEQ ID N°: 252 son K o R. En otra realización, el constructo transportador de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en la secuencia rX₁X₂X₃rX₄X₅X₆r (SEQ ID N°: 252), en la que X₁ es K, X₂ es K, X₃ es R y X₄, X₅ y X₆ son cualquier L-aminoácido y se seleccionan independientemente entre sí. De modo similar, el constructo transportador de acuerdo con la presente invención puede comprender o consistir en la secuencia rX₁X₂X₃rX₄X₅X₆r (SEQ ID N°: 252), en la que X₄ es Q, X₅ es R, X₆ es R y X₁, X₂ y X₃ son cualquier L-aminoácido y se seleccionan independientemente entre sí. El constructo transportador de la invención también puede comprender o consistir en la secuencia rX₁X₂X₃rX₄X₅X₆r (SEQ ID N°: 252), en la que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de X aminoácido se seleccionan entre el grupo consistente en: X₁ es K, X₂ es K, X₃ es R, X₄ es Q, X₅ es R, X₆ es R, mientras que los residuos de X aminoácido restantes no seleccionados entre el grupo arriba mostrado pueden ser cualquier L-aminoácido y se seleccionan independientemente entre sí. X₁ es preferentemente Y y/o X₄ es preferentemente K o R. También se

consideran de modo similar secuencias inversas de las secuencias y realizaciones arriba mencionadas de la SEQ ID N°: 252.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que una tirosina (Y) en la posición 2 de la fórmula (I) arriba mostrada no sólo aumenta significativamente la absorción, sino que también produce un aumento significativo de la concentración intracelular después de la inoculación durante 25 horas. Esto se observa en particular en constructo transportadores que comprenden una secuencia de tráfico derivada de la proteína VIH-1 TAT tal como se muestra en la Tabla 1, que muestra una Y en la posición 2, preferentemente tiene 9 aa y presenta la secuencia de consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252). Por tanto, de acuerdo con una realización particularmente preferente de la presente invención, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba comprende constructo transportadores de acuerdo con la subfórmula (If) tal como se define más arriba, aplicándose la subfórmula (If) a una secuencia de tráfico derivada de la proteína VIH-1 TAT que tiene una tirosina (Y) en la posición 2 de la secuencia derivada de TAT. De forma incluso más preferente, la subfórmula (If) se aplica a una secuencia de tráfico derivada de VIH-1 TAT que tiene una tirosina (Y) en la posición 2 de la secuencia derivada de TAT, teniendo el constructo transportador tal como se define más arriba de acuerdo con la subfórmula (If) arriba definido preferentemente 9 aa y la secuencia de consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252, estando indicados los aminoácidos D-enantioméricos con una letra minúscula y los aminoácidos L-enantioméricos con una letra mayúscula). De forma totalmente preferente, la subfórmula (If) se aplica a una secuencia de tráfico derivada de VIH-1 TAT, teniendo el constructo transportador tal como se define más arriba de acuerdo con la subfórmula (If) preferentemente 9 aa y la secuencia de consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252) y seleccionándose la secuencia de tráfico entre la secuencia TAT(s2-91) (SEQ ID N°: 116). Los constructo transportadores de la invención tal como se definen más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas pueden comprender además al menos una modificación, preferentemente en sus extremos, en el extremo C o en el extremo N, o en ambos. El extremo C se puede modificar preferentemente mediante una modificación de amida, mientras que el extremo N se puede modificar mediante cualquier grupo de protección de NH₂ adecuado, por ejemplo acilación, o cualquier otra modificación tal como se ya se ha indicado más arriba en relación con los L-aminoácidos y D-aminoácidos. Estas modificaciones también incluyen la introducción de marcadores tal como se definen más arriba.

Los constructos transportadores de la invención tal como se definen más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas se pueden obtener o producir mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante síntesis química tal como se define más arriba o por métodos de ingeniería genética.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, el objeto subyacente se resuelve mediante una molécula conjugada transportador-carga que contiene como componente (A) el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas, y como componente (B) una molécula efectora seleccionada entre proteínas y péptidos terapéuticamente activos, inhibidores de proteína-quinasa, en particular inhibidores de la proteína-quinasa c-Jun quinasa amino terminal, antígenos, anticuerpos, factores apoptóticos, proteasas implicadas en estados patológicos, preferentemente inhibidores de proteasas peptídicas, dominios BH3, proteínas solo BH3, ácidos nucleicos que codifican estas proteínas ARNip, ARN antisentido, agentes citotóxicos y pequeños compuestos orgánicos.

En el contexto de la presente invención, una proteína o un péptido terapéuticamente activos adecuados como molécula efectora para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar, de forma no exclusiva, entre proteínas capaces de estimular o inhibir la transducción de señales en la célula, por ejemplo citoquinas, anticuerpos, etc. Por tanto, las proteínas terapéuticamente activas pueden comprender citoquinas de clase I de la familia de las citoquinas, que tienen 4 residuos de cisteína conservados posicionalmente (CCCC) y comprenden un motivo de secuencia conservado Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS; SEQ ID N°: 253), en el que X es un aminoácido no conservado. Las citoquinas de la clase I de la familia de las citoquinas comprenden la subfamilia GM-CSF, por ejemplo IL-3, IL-5, GM-CSF, la subfamilia IL-6, por ejemplo IL-6, IL-11, IL-12, o la subfamilia IL-2, por ejemplo IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, etc., o las citoquinas IL-1alfa, IL-1beta, IL-10 etc. Las proteínas terapéuticamente activas también pueden comprender citoquinas de la clase II de la familia de las citoquinas, que también comprenden 4 residuos de cisteína conservados posicionalmente (CCCC; SEQ ID N°: 254), pero ningún motivo de secuencia conservado Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS; SEQ ID N°: 253). Las citoquinas de la clase II de la familia de las citoquinas comprenden, por ejemplo, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, etc. Las proteínas terapéuticamente activas pueden comprender adicionalmente citoquinas de la familia de los factores de necrosis tumoral, por ejemplo TNF-alfa, TNF-beta, etc., o citoquinas de la familia de las quimiocinas, que comprenden 7 hélices transmembrana e interaccionan con proteína G, por ejemplo IL-8, MIP-1, RANTES, CCR5, CXR4, etc., o receptores específicos de citoquinas tales como TNF-RI, TNF-RII, CD40, OX40 (CD134), Fas, o de fragmentos o variantes de las mismas. Preferentemente, estos fragmentos y variantes presentan una

homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80% o aproximadamente un 90% con una de las secuencias de proteínas o péptidos arriba mostradas o descritas. En este contexto, los fragmentos y variantes son preferiblemente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.

Proteínas terapéuticamente activas adecuadas como molécula efectora del componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención también se pueden seleccionar de entre cualquiera de las proteínas indicadas a continuación: 0ATL3, 0FC3, 0PA3, 0PD2, 4-1BBL, 5T4, 6Ckine, 707-AP, 9D7, A2M, AA, AAAS, AACT, AASS, ABAT, ABCA1, ABCA4, ABCB1, ABCB11, ABCB2, ABCB4, ABCB7, ABCC2, ABCC6, ABCC8, ABCD1, ABCD3, ABCG5, ABCG8, ABL1, ABO, ABR ACAA1, ACACA, ACADL, ACADM, ACADS, ACADVL, ACAT1, ACCPN, ACE, ACHE, ACHM3, ACHM1, ACLS, ACPI, ACTA1, ACTC, ACTN4, ACVRL1, AD2, ADA, ADAMTS13, ADAMTS2, ADFN, ADH1B, ADH1C, ADLDH3A2, ADRB2, ADRB3, ADSL, AEZ, AFA, AFD1, AFP, AGA, AGL, AGMX2, AGPS, AGS1, AGT, AGTR1, AGXT, AH02, AHCY, AHDS, AHHR, AHSG, AIC, AIED, AIH2, AIH3, AIM-2, AIPL1, AIRE, AK1, ALAD, ALAS2, ALB, HPG1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH1A1, ALDOA, ALDOB, ALMS1, ALPL, ALPP, ALS2, ALX4, AMACR, AMBP, AMCD, AMCD1, AMCN, AMELX, AMELY, AMGL, AMH, AMHR2, AMPD3, AMPD1, AMT, ANC, ANCR, ANK1, ANOP1, AOM, AP0A4, AP0C2, AP0C3, AP3B1, APC, aPKC, APOA2, APOA1, APOB, APOC3, APOC2, APOE, APOH, APP, APRT, APS1, AQP2, AR, ARAF1, ARG1, ARHGEF12, ARMET, ARSA, ARSB, ARSC2, ARSE, ART-4, ARTC1/m, ARTS, ARVD1, ARX, AS, ASAH, ASAT, ASD1, ASL, ASMD, ASMT, ASNS, ASPA, ASS, ASSP2, ASSP5, ASSP6, AT3, ATD, ATHS, ATM, ATP2A1, ATP2A2, ATP2C1, ATP6B1, ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ATPSK2, ATRX, ATXN1, ATXN2, ATXN3, AUTS1, AVMD, AVP, AVPR2, AVSD1, AXIN1, AXIN2, AZF2, B2M, B4GALT7, B7H4, BAGE, BAGE-1, BAX, BBS2, BBS3, BBS4, BCA225, BCAA, BCH, BCHE, BCKDHA, BCKDHB, BCL10, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCPM, BCR, BCR/ABL, BDC, BDE, BDMF, BDMR, BEST1, beta-Catenina/m, BF, BFHD, BFIC, BFLS, BFSP2, BGLAP, BGN, BHD, BHR1, BING-4, BIRC5, BJS, BLM, BLMH, BLNK, BMPR2, BPGM, BRAF, BRCA1, BRCA1/m, BRCA2, BRCA2/m, BRCD2, BRCD1, BRDT, BSCL, BSCL2, BTAA, BTD, BTK, BUB1, BWS, BZX, COL2A1, COL6A1, C1NH, C1QA, C1QB, C1QG, C1S, C2, C3, C4A, C4B, C5, C6, C7, C7orf2, C8A, C8B, C9, CA125, CA15-3/CA 27-29, CA195, CA19-9, CA72-4, CA2, CA242, CA50, CABYR, CACD, CACNA2D1, CACNA1 A, CACNA1F, CACNA1S, CACNB2, CACNB4, CAGE, CA1, CALB3, CALCA, CALCR, CALM, CALR, CAM43, CAMEL, CAP-1, CAPN3, CARD15, CASP-5/m, CASP-8, CASP-8/m, CASR, CAT, CATM, CAV3, CB1, CBBM, CBS, CCA1, CCAL2, CCAL1, CCAT, CCL-1, CCL-11, CCL-12, CCL-13, CCL-14, CCL-15, CCL-16, CCL-17, CCL-18, CCL-19, CCL-2, CCL-20, CCL-21, CCL-22, CCL-23, CCL-24, CCL-25, CCL-27, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-7, CCL-8, CCM1, CCNB1, CCND1, CCO, CCR2, CCR5, CCT, CCV, CCZS, CD1, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD27L, cD3, CD30, CD30, CD30L, CD33, CD36, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD44v, CD44v6, CD52, CD55, CD56, CD59, CD80, CD86, CDAN1, CDAN2, CDAN3, CDC27, CDC27/m, CDC2L1, CDH1, CDK4, CDK4/m, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2A/m, CDKN1A, CDKN1C, CDL1, CDPD1, CDR1, CEA, CEACAM1, CEACAM5, CECR, CECR9, CEPA, CETP, CFNS, CFTR, CGF1, CHAC, CHED2, CHED1, CHEK2, CHM, CHML, CHR39C, CHRNA4, CHRNA1, CHRNB1, CHRNE, CHS, CHS1, CHST6, CHX10, CIAS1, CIDX, CKN1, CLA2, CLA3, CLA1, CLCA2, CLCN1, CLCN5, CLCNKB, CLDN16, CLP, CLN2, CLN3, CLN4, CLN5, CLN6, CLN8, C1QA, C1QB, C1QG, C1 R, CLS, CMCWTD, CMDJ, CMD1 A, CMD1B, CMH2, MH3, CMH6, CMKBR2, CMKBR5, CML28, CML66, CMM, CMT2D, CMT2B, CMT2D, CMT4A, CMT1A, CMTX2, CMTX3, C-MYC, CNA1, CND, CNGA3, CNGA1, CNGB3, CNSN, CNTF, COA-1/m, COCH, COD2, COD1, COH1, COL10A, COL2A2, COL11A2, COL17A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL7A1, COL8A2, COL9A2, COL9A3, COL11A1, COL1A2, COL23A1, COL1A1, COLQ, COMP, COMT, CORDS, CORD1, COX10, COX-2, CP, CPB2, CPO, CPP, CPS1, CPT2, CPT1A, CPX, CRAT, CRB1, CRBM, CREBBP, CRH, CRHBP, CRS, CRV, CRX, CRYAB, CRYBA1, CRYBB2, CRYGA, CRYG, CRYGD, CSA, CSE, CSF1 R, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, CSF1R, CST3, CSTB, CT, CT7, CT-9/BRD6, CTAA1, CTACK, CTEN, CTH, CTHM, CTLA4, CTM, CTNNB1, CTNS, CTPA, CTSB, CTSC, CTSK, CTSL, CTS1, CUBN, CVD1, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CYB5, CYBA, CYBB, CYBB5, CYFRA21-1, CYLD, CYLD1, CYMD, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP17A1, CYP19, CYP19A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP21A2, CYP27A1, CYP27B1, CYP2A6, CYP2C, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D, CYP2D6, CYP2D7P1, CYP3A4, CYP7B1, CYPB1, CYP11B1, CYP1A1, CYP1B1, CYRAA, D40, DADI, DAM, DAM-10/MAGE-B1, DAM-6/MAGE-B2, DAX1, DAZ, DBA, DBH, DBI, DBT, DCC, DC-CK1, DCK, DCR, DCX, DDB 1, DDB2, DDIT3, DDU, DECR1, DEK-CAN, DEM, DES, DF, DFN2, DFN4, DFN6, DFNA4, DFNA5, DFN5, DGCR, DHCR7, DHFR, DHOF, DHS, DIA1, DIAPH2, DIAPH1, DIH1, DIO1, DISC1, DKC1, DLAT, DLD, DLL3, DLX3, DMBT1, DMD, DM1, DMPK, DMWD, DNAI1, DNASE1, DNMT3B, DPEP1, DPYD, DPYS, DRD2, DRD4, DRPLA, DSCR1, DSG1, DSP, DSPP, DSS, DTDP2, DTR, DURS1, DWS, DYS, DYSF, DYT2, DYT3, DYT4, DYT2, DYT1, DYX1, EBAF, EBM, EBNA, EBP, EBR3, EBS1, ECA1, ECB2, ECE1, ECGF1, ECT, ED2, ED4, EDA, EDAR, ECA1, EDN3, EDNRB, EEC1, EEF1A1L14, EEGV1, EFEMP1, EFTUD2/m, EGFR, EGFR/Her1, EGI, EGR2, EIF2AK3, eIF4G, EKV, EI IS, ELA2, ELF2, ELF2M, ELK1, ELN, ELONG, EMD, EML1, EMMPRIN, EMX2, ENA-78, ENAM, END3, ENG, ENO1, ENPP1, ENUR2, ENUR1,

EOS, EP300, EPB41, EPB42, EPCAM, EPD, EphA1, EphA2, EphA3, EfrinaA2, EfrinaA3, EPHX1, EPM2A, EPO, EPOR, EPX, ERBB2, ERCC2 ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERVR, ESR1, ETFA, ETFB, ETFDH, ETM1, ETV6-AML1, ETV1, EVC, EVR2, EVR1, EWSR1, EXT2, EXT3, EXT1, EYA1, EYCL2, EYCL3, EYCL1, EZH2, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2, F5, F5F8D, F7, F8, F8C, F9, FABP2, FACL6, FAH, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCF, FasL, FBN2, FBN1, FBP1, FCG3RA, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCHL, FCMD, FCP1, FDP5L5, FECH, FEO, FEOM1, FES, FGA, FGB, FGD1, FGF2, FGF23, FGF5, FGFR2, FGFR3, FGFR1, FGG, FGS1, FH, FIC1, FII, F2, FKBP6, FLNA, FLT4, FMO3, FMO4, FMR2, FMR1, FN, FN1/m, FOXC1, FOXE1, FOXL2, FOXO1A, FPDMM, FPF, Fra-1, FRAXF, FRDA, FSHB, FSHMD1A, FSHR, FTH1, FTHL17, FTL, FTZF1, FUCA1, FUT2, FUT6, FUT1, FY, G250, G250/CAIX, G6PC, G6PD, G6PT1, G6PT2, GAA, GABRA3, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GALC, GALE, GALK1, GALNS, GALT, GAMT, GAN, GAST, GASTRIN17, GATA3, GATA, GBA, GBE, GC, GCDH, CGCR, GCH1, GCK, GCP-2, GCS1, G-CSF, GCSH, GCSL, GCY, GDEP, GDF5, GDI1, GDNF, GDXY, GFAP, GFND, GGX, GGT1, GH2, GH1, GHR, GHRHR, GHS, GIF, GINGF, GIP, GJA3, GJA8, GJB2, GJB3, GJB6, GJB1, GK, GLA, GLB, GLB1, GLC3B, GLC1B, GLC1C, GLDC, GLI3, GLP1, GLRA1, GLUD1, GM1 (fuc-GM1), GM2A, GM-CSF, GMPR, GNAI2, GNAS, GNAT1, GNB3, GNE, GNPTA, GNRH, GNRH1, GNRHR, GNS, GnT-V, gp100, GP1BA, GP1BB, GP9, GPC3, GPD2, GPDS1, GPI, GP1BA, GPN1LW, GPNMB/m, GPSC, GPX1, GRHR, GRK1, GRO α , GRO β , GRO γ , GRPR, GSE, GSM1, GSN, GSR, GSS, GTD, GTS, GUCA1A, GUCY2D, GULOP, GUSB, GUSM, GUST, GYPA, GYPC, GYS1, GYS2, HOKPP2, HMG2, HADHA, HADHB, HAGE, HAGH, HAL, HAST-2, HB 1, HBA2, HBA1, HBB, HBBP1, HBD, HBE1, HBG2, HBG1, HBHR, HBP1, HBQ1, HBZ, HBZP, HCA, HCC-1, HCC-4, HCF2, HCG, HCL2, HCL1, HCR, HCVS, HD, HPN, HER2, HER2/NEU, HER3, HERV-K-MEL, HESX1, HEXA, HEXB, HF1, HFE, HF1, HGD, HHC2, HHC3, HHG, HK1 HLA-A, HLA-A*0201-R170I, HLA- A11/m, HLA-A2/m, HLA-DPB1 HLA-DRA, HLCS, HLXB9, HMBS, HMG2, HMGCL, HMI, HMN2, HMOX1, HMS1 HMW-MAA, HND, HNE, HNF4A, HOAC, HOMEBOX NKX 3.1, HOM- TES-14/SCP-1, HOM- TES-85, HOXA1 HOXD13, HP, HPC1, HPD, HPE2, HPE1, HPFH, HPFH2, HPRT1, HPS1, HPT, HPV-E6, HPV-E7, HR, HRAS, HRD, HRG, HRPT2, HRPT1, HRX, HSD11B2, HSD17B3, HSD17B4, HSD3B2, HSD3B3, HSN1, HSP70-2M, HSPG2, HST-2, HTC2, HTC1, hTERT, HTN3, HTR2C, HVBS6, HVBS1, HVEC, HV1S, HYAL1, HYR, I-309, IAB, IBGC1, IBM2, ICAM1, ICAM3, iCE, ICHQ, ICR5, ICR1, ICS 1, IDDM2, IDDM1, IDS, IDUA, IF, hIFNa/b, hIFNGR1, IGAD1, IGER, IGF-1R, IGF2R, IGF1, IGH, IGH2, IGHG2, IGHG1, IGHM, IGHR, IGKC, IHG1, IHH, IKBKKG, IL1, IL-1 RA, IL10, IL-11, IL12, IL12RB1, IL13, IL-13R α 2, IL-15, IL-16, IL-17, IL18, IL-1a, IL-1 α , IL-1b, IL-1 β , IL1RAPL1, IL2, IL24, IL-2R, IL2RA, IL2RG, IL3, IL3RA, IL4, IL4R, IL4R, IL-5, IL6, IL-7, IL7R, IL-8, IL-9, receptor de laminina inmadura, IMMP2L, INDX, INFGR1, INFGR2, INF α , IFN γ , INS, INSR, INVS, IP-10, IP2, IPF1, IP1, IRF6, IRS1, ISCW, ITGA2, ITGA2B, ITGA6, ITGA7, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITIH1, ITM2B, IV, IVD, JAG1, JAK3, JBS, JBTS1, JMS, JPD, KAL1, KAL2, KALI, KLK2, KLK4, KCNA1, KCNE2, KCNE1, KCNH2, KCNJ1, KCNJ2, KCNJ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4, KCNQ1, KCS, KERA, KFM, KFS, KFSD, KHK, ki-67, KIAA0020, KIAA0205, KIAA0205/m, KIF1B, KIT, KK-LC-1, KLK3, KLKB1, KM-HN-1, KMS, KNG, KNO, K-RAS/m, KRAS2, KREV1, KRT1, KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT14L1, KRT14L2, KRT14L3, KRT16, KRT16L1, KRT16L2, KRT17, KRT18, KRT2A, KRT3, KRT4, KRT5, KRT6 A, KRT6B, KRT9, KRTHB1, KRTHB6, KRT1, KSA, KSS, KWE, KYNU, LOH19CR1, L1CAM, LAGE, LAGE-1, LALL, LAMA2, LAMA3, LAMB3, LAMB1, LAMC2, LAMP2, LAP, LCA5, LCAT, LCCS, LCCS 1, LCFS2, LCS1, LCT, LDHA, LDHB, LDHC, LDLR, LDLR/FUT, LEP, LEWISY, LGCR, LGGF- PBP, LGI1, LGMD2H, LGMD1A, LGMD1B, LHB, LHCGR, LHON, LHRH, LHX3, LIF, LIG1, LIMM, LIMP2, LIPA, LIPA, LIPB, LIPC, LIVIN, L1CAM, LMAN1, LMNA, LMX1B, LOLR, LOR, LOX, LPA, LPL, LPP, LQT4, LRP5, LRS 1, LSFC, LT- p , LTBP2, LTC4S, LYL1, XCL1, LYZ, M344, MA50, MAA, MADH4, MAFD2, MAFD1, MAGE, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGEB1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE- B17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE- D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, MGB1, MGB2, MAN2A1, MAN2B1, MANBA, MANBB, MAOA, MAOB, MAPK8IP1, MAPT, MART-1, MART-2, MART2/m, MAT1A, MBL2, MBP, MBS1, MC1R, MC2R, MC4R, MCC, MCCC2, MCCC1, MCDR1, MCF2, MCKD, MCL1, MC1R, MCOLN1, MCOP, MCOR, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCPH2, MCPH1, MCS, M-CSF, MDB, MDCR, MDM2, MDRV, MDS 1, ME1, ME1/m, ME2, ME20, ME3, MEAX, MEB, MEC CCL-28, MECP2, MEFV, MELANA, MELAS, MEN1 MSLN, MET, MF4, MG50, MG50/PXDN, MGAT2, MGAT5, MGC1 MGCR, MGCT, MGI, MGP, MHC2TA, MHS2, MHS4, MIC2, MIC5, MIDI, MIF, MIP, MIP-5/HCC-2, MITF, MJD, MKI67, MKKS, MKS1, MLH1, MLL, MLLT2, MLLT3, MLLT7, MLLT1, MLS, MLYCD, MMA1a, MMP 11, MMVP1, MN/CA IX-Antígeno, MNG1, MN1, MOC31, MOCS2, MOCS1, MOG, MORC, MOS, MOV18, MPD1, MPE, MPFD, MPI, MPIF-1, MPL, MPO, MPS3C, MPZ, MRE11A, MROS, MRP1, MRP2, MRP3, MRSD, MRX14, MRX2, MRX20, MRX3, MRX40, MRXA, MRX1, MS, MS4A2, MSD, MSH3, MSH6, MSS, MSSE, MSX2, MSX1, MTATP6, MTCO3, MTCO1, MTCYB, MTHFR, MTM1, MTMR2, MTND2, MTND4, MTND5, MTND6, MTND1, MTP, MTR, MTRNR2, MTRNR1, MTRR, MTTE, MTTG, MTTI, MTTK, MTTL2, MTTL1, MTTN, MTTT, MTTT1, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUM-1, MUM-1/m, MUM-2, MUM-2/m, MUM-3, MUM-3/m, MUT, p21 ras mutante, MUTYH, MVK, MX2, MX11, MYO5A, MYB, MYBPC3, MYC, MYCL2, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYMY, MYO15A, MYO1G, MYO5A, MYO7A, MYOC, Miosina/m, MYP2, MYP1, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, NAGA, NAGLU, NAMSD, NAPB, NAT2, NAT, NBIA1, NBS1, NCAM, NCF2, NCF1, NDN, NDP, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEB, NEFH, NEM1, Neo-PAP, neo-PAP/m, NEU1, NEUROD1, NF2, NF1,

NFYC/m, NGEP, NHS, NKS1, NKX2E, NM, NME1, NMP22, NMTC, NODAL, NOG, NOS3, NOTCH3,
 NOTCH1, NP, NPC2, NPC1, NPHL2, NPHP1, NPHS2, NPHS1, NPM/ALK, NPPA, NQO1, NR2E3, NR3C1,
 NR3C2, NRAS, NRAS/m, NRL, NROB1, NRTN, NSE, NSX, NTRK1, NUMA1, NXF2, NY-CO1, NY-ESO1, NY-
 ESO-B, NY-LU-12, ALDOA, NYS2, NYS4, NY-SAR-35, NYS1, NYX, OA3, OA1, OAP, OASD, OAT, OCA1,
 5 OCA2, OCD1, OCRL, OCRL1, OCT, ODDD, ODT1, OFC1, OFD1, OGDH, OGT, OGT/m, OPA2, OPA1,
 OPD1, OPEM, OPG, OPN, OPN1 LW, OPN1MW, OPN1 SW, OPPG, OPTB1, TTD, ORM1, ORP1, OS-9, OS-
 9/m, OSM LIF, OTC, OTOF, OTSC1, OXCT1, OYTES1, P15, P190 MINOR BCR-ABL, P2RY12, P3, P16,
 P40, P4HB, P-501, P53, P53/m, P97, PABPN1, PAFAH1B1, PAFAH1P1, PAGE-4, PAGE-5, PAH, PAI-1, PAI-
 2, PAK3, PAP, PAPP, PARK2, PART-1, PATE, PAX2, PAX3, PAX6, PAX7, PAX8, PAX9, PBCA, PBCRA1,
 10 PBT, PBX1, PBXP1, PC, PCBD, PCCA, PCCB, PCK2, PCK1, PCLD, PCOS1, PCSK1, PDB1, PDCN, PDE6A,
 PDE6B, PDEF, PDGFB, PDGFR, PDGFRL, PDHA1, PDR, PDX1, PECAM1, PEE1, PEO1, PEPD, PEX10,
 PEX12, PEX13, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PEX1, PF4, PFBI, PFC, PFKFB1, PFKM, PGAM2, PGD, PGK1,
 PGK1P1, PGL2, PGR, PGS, PHA2A, PHB, PHEX, PHGDH, PHKA2, PHKA1, PHKB, PHKG2, PHP, PHYH,
 PI, PI3, PIGA, PIM1-KINASE, PIN1, PIP5K1B, PITX2, PITX3, PKD2, PKD3, PKD1, PKDT5, PKHD1, PKLR,
 15 PKP1, PKU1, PLA2G2A, PLA2G7, PLAT, PLEC1, PLG, PLI, PLOD, PLP1, PMEL17, PML, PML/RAR α ,
 PMM2, PMP22, PMS2, PMS1, PNKD, PNL1P, POF1, POLA, POLH, POMC, PON2, PON1, PORC, POTE,
 POU1F1, POU3F4, POU4F3, POU1F1, PPAC, PPARG, PPCD, PPGB, PPH1, PPKB, PPMX, PPOX, PPP1
 R3A, PPP2R2B, PPT1, PRAME, PRB, PRB3, PRCA1, PRCC, PRD, PRDX5/m, PRF1, PRG4, PRKAR1A,
 PRKCA, PRKDC, PRKWNK4, PRNP, PROC, PRODH, PROM1, PROP1, PROS1, PRST, PRP8, PRPF31,
 20 PRPF8, PRPH2, PRPS2, PRPS1, PRS, PRSS7, PRSS1, PRTN3, PRX, PSA, PSAP, PSCA, PSEN2, PSEN1,
 PSG1, PSGR, PSM, PSMA, PSORS1, PTC, PTCH, PTCH1, PTCH2, PTEN, PTGS1, PTH, PTHR1, PTLAH,
 PTOS1, PTPN12, PTPNI 1, PTPRK, PTPRK/m, PTS, PUJO, PVR, PVRL1, PWCR, PXE, PXMP3, PXR1,
 PYGL, PYGM, QDPR, RAB27A, RAD54B, RAD54L, RAG2, RAGE, RAGE-1, RAG1, RAP1, RARA, RASA1,
 RBAF600/m, RB1, RBP4, RBP4, RBS, RCA1, RCAS1, RCCP2, RCD1, RCV1, RDH5, RDPA, RDS, RECQL2,
 25 RECQL3, RECQL4, REG1A, REHOBE, REN, RENBP, RENS1, RET, RFX5, RFXANK, RFXAP, RGR, RHAG,
 RHAMM/CD168, RHD, RHO, Rip-1, RLBP1, RLN2, RLN1, RLS, RMD1, RMRP, ROM1, ROR2, RP, RP1,
 RP14, RP17, RP2, RP6, RP9, RPD1, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RP1, RP10, RPS19, RPS2, RPS4X, RPS4Y,
 RPS6KA3, RRAS2, RS1, RSN, RSS, RU1, RU2, RUNX2, RUNXI, RWS, RYR1, S-100, SAA1, SACS, SAG,
 SAGE, SALL1, SARDH, SART1, SART2, SART3, SAS, SAX1, SCA2, SCA4, SCA5, SCA7, SCA8, SCA1,
 30 SCC, SCCD, SCF, SCLC1, SCN1A, SCN1B, SCN4A, SCN5A, SCNN1 A, SCNN1B, SCNN1G, SCO2, SCP1,
 SCZD2, SCZD3, SCZD4, SCZD6, SCZD1, SDF-1 α /hhSDHA, SDHD, SDYS, SEDL, SERPENA7, SERPINA3,
 SERPINA6, SERPINA1, SERPINC1, SERPIND1, SERPINE1, SERPINF2, SERPING1, SERPINI1, SFTPA1,
 SFTPB, SFTPC, SFTPD, SGCA, SGCB, SGCD, SGCE, SGM1, SGSH, SGY-1, SH2D1A, SHBG, SHFM2,
 SHFM3, SHFM1, SHH, SHOX, SI, SIAL, SIALYL LEWISX, SIASD, S11, SIM1, SIRT2/m, SIX3, SJS1, SKP2,
 35 SLC10A2, SLC12A1, SLC12A3, SLC17A5, SLC19A2, SLC22A1L, SLC22A5, SLC25A13, SLC25A15,
 SLC25A20, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A4,
 SLC3A1, SLC4A1, SLC4A4, SLC5A1, SLC5A5, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC7A7, SLC7A9, SLC11A1,
 SLOS, SMA, SMAD1, SMAL, SMARCB1, SMAX2, SMCR, SMCY, SM1, SMN2, SMN1, SMPD1, SNCA,
 SNRPN, SOD2, SOD3, SOD1, SOS1, SOST, SOX9, SOX10, Sp17, SPANXC, SPG23, SPG3A, SPG4,
 40 SPG5A, SPG5B, SPG6, SPG7, SPINK1, SPINK5, SPPK, SPPM, SPSMA, SPTA1, SPTB, SPTLC1, SRC,
 SRD5A2, SRPX, SRS, SRY, β hCG, SSTR2, SSX1, SSX2 (HOM-MEL-40/SSX2), SSX4, ST8, STAMP-1,
 STAR, STARP1, STATH, STEAP, STK2, STK11, Stn/ KLH, STO, STOM, STS, SUOX, SURF1, SURVIVIN-
 2B, SYCP1, SYM1, SYN1, SYN51, SYP, SYT/SSX, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAAL6, TACSTD1,
 TACSTD2, TAG72, TAF7L, TAF1, TAGE, TAG-72, TALI, TAM, TAP2, TAP1, TAPVR1, TARC, TARP, TAT,
 45 TAZ, TBP, TBX22, TBX3, TBX5, TBXA2R, TBXAS1, TCAP, TCF2, TCF1, TCIRG1, TCL2, TCL4, TCL1A,
 TCN2, TCOF1, TCR, TCRA, TDD, TDFA, TDRD1, TECK, TECTA, TEK, TEL/AML1, TELAB1, TEX15, TF,
 TFAP2B, TFE3, TFR2, TG, TGFA, TGF- α , TGF β , TGFBI, TGFB1, TGFB2, TGFBRE, TGF β , TGF β R1I, TGIF,
 TGM-4, TGM1, TH, THAS, THBD, THC, THC2, THM, THPO, THRA, THRB, TIMM8A, TIMP2, TIMP3, TIMP1,
 TITF1, TKCR, TKT, TLP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLX1,
 50 TM4SF1, TM4SF2, TMC1, TMD, TMIP, TNDM, TNF, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TNFRSF6, TNFSF5,
 TNFSF6, TNF α , INF β , TNNT3, TNNT2, TOC, TOP2A, TOP1, TP53, TP63, TPA, TPBG, TPI, TPI/m, TPI1,
 TPM3, TPM1, TPMT, TPO, TPS, TPTA, TRA, TRAG3, TRAPPC2, TRC8, TREH, TRG, TRH, TRIM32,
 TRIM37, TRP1, TRP2, TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, TRPS1, TS, TSC2, TSC3, TSC1, TSG101, TSHB,
 TSHR, TSP-180, TST, TTGA2B, TTN, TTPA, TTR, TU M2-PK, TULP1, TWIST, TYH, TYR, TYROBP,
 55 TYROBP, TYRP1, TYS, UBE2A, UBE3A, UBE1, UCHL1, UFS, UGT1A, ULR, UMPK, UMPS, UOX, UPA,
 UQCRC1, URO5, UROD, UPK1B, UROS, USH2A, USH3A, USH1A, USH1C, USP9Y, UV24, VBCH, VCF,
 VDI, VDR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-1, VEGFR-2/FLK-1, VHL, VIM, VMD2, VMD1, VMGLOM, VNEZ, VNF,
 VP, VRNI, VWF, VWS, WAS, WBS2, WFS2, WFS1, WHCR, WHN, WISP3, WMS, WRN, WS2A, WS2B,
 WSN, WSS, WT2, WT3, WT1, WTS, WWS, XAGE, XDH, XIC, XIST, XK, XM, XPA, XPC, XRCC9, XS,
 60 ZAP70, ZFH1B, ZFX, ZFY, ZIC2, ZIC3, ZNF145, ZNF261, ZNF35, ZNF41, ZNF6, ZNF198, ZWS1, o entre
 fragmentos o variantes de las mismas. Preferentemente, estos fragmentos y variantes presentan una
 homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%,
 aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%,
 aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80% o aproximadamente un 90% con una de las proteínas o

péptidos o secuencias de proteínas o péptidos arriba mostradas o descritas. En este contexto, la definición de fragmentos y variantes es aplicable similarmente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.

5 Las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención también se pueden seleccionar a partir de inhibidores de la proteína-quinasa, en particular inhibidores de la proteína-quinasa c-Jun quinasa amino terminal, es decir, un inhibidor de JNK. Normalmente, un inhibidor de JNK adecuado como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se puede derivar de una secuencia IB1 humana o de rata, preferentemente de una secuencia de aminoácidos tal como se define o codificada mediante cualquiera de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID N°: 137 (representa la secuencia de ADNc IB1 de rata y su secuencia de aminoácidos prevista), SEQ ID N°: 138 (representa la secuencia de proteínas IB1 de rata codificada por el límite exón-intrón del gen rIB1 - donante de corte), SEQ ID N°: 139 (representa la secuencia de proteínas IB1 de *Homo sapiens*), o SEQ ID N°: 140 (representa la secuencia de ADNc IB1 de *Homo sapiens*), de forma especialmente preferente a partir de una secuencia de aminoácidos tal como se define o codificada mediante cualquiera de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID N°: 139 (representa la secuencia de proteínas IB1 de *Homo sapiens*), o SEQ ID N°: 140 (representa la secuencia de ADNc IB1 de *Homo sapiens*), o de cualquier fragmento o variante de las mismas. En este contexto, la definición de fragmentos y variantes es aplicable similarmente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.

20 Preferentemente, una secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tiene una longitud total de menos de 150 residuos aminoácidos, preferentemente entre 5 y 150 residuos aminoácidos, de forma especialmente preferente entre 10 y 100 residuos aminoácidos, de forma incluso más preferente entre 10 y 75 residuos aminoácidos y de forma totalmente preferente entre 10 y 50 residuos aminoácidos, por ejemplo 10 a 30, 10 a 20 o 10 a 15. De forma especialmente preferente, una secuencia inhibidora de JNK y los intervalos arriba mencionados se pueden seleccionar entre cualquiera de las secuencias inhibidoras de JNK aquí mencionadas, de forma incluso más preferente entre una secuencia de aminoácidos tal como se define de acuerdo con la SEQ ID N°: 139 o tal como se codifica mediante la SEQ ID N°: 140, de forma particularmente preferente en la región entre los nucleótidos 420 y 980 de la SEQ ID N°: 140 o los aminoácidos 105 y 291 de la SEQ ID N°: 139, y de forma totalmente preferente en la región entre los nucleótidos 561 y 647 de la SEQ ID N°: 140 o los aminoácidos 152 y 180 de la SEQ ID N°: 139.

35 De acuerdo con una realización particular, una secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se une normalmente a JNK y/o inhibe la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun o ATF2 (véanse, por ejemplo, las SEQ ID N°: 147 y 148, respectivamente) o Elk1.

40 De modo similar, una secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención comprende o consiste en al menos una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220, o un fragmento, derivado o variante de las mismas. De forma especialmente preferente, la secuencia inhibidora de JNK tal como se utiliza aquí puede contener 1, 2, 3, 4 o incluso más copias de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID N°: 137 a 220, o una variante, fragmento o derivado de las mismas. Si están presentes en más de una copia, estas secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID N°: 137 a 220, o variantes, fragmentos o derivados de las mismas, tal como se utilizan aquí, pueden estar unidas directamente entre sí sin ninguna secuencia de engarce o a través de una secuencia de engarce que comprende de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5 aminoácidos. Los aminoácidos que forman la secuencia de engarce se seleccionan preferentemente entre glicina o prolina como residuos aminoácidos. De forma especialmente preferente, estas secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID N°: 137 a 220, o fragmentos, variantes o derivados de las mismas, tal como se utilizan aquí, pueden estar separadas entre sí por una bisagra de dos, tres o más residuos de prolina.

50 La secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede estar compuesta por L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos. Preferentemente, las secuencias inhibidoras de JNK tal como se utilizan aquí comprenden al menos 1 o incluso 2, preferentemente al menos 3, 4 o 5, de forma especialmente preferente al menos 6, 7, 8 o 9 y de forma todavía más preferente al menos 10 o más D- y/o L-aminoácidos, pudiendo estar dispuestos los D- y/o L-aminoácidos en las secuencias inhibidoras de JNK, tal como se utilizan aquí, por bloques, no por bloques o de modo alternado.

De acuerdo con una realización preferente, la secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede estar compuesta exclusivamente por L-aminoácidos. En este caso, las secuencias inhibidoras de JNK tal como se utilizan aquí pueden comprender o

consistir en al menos una "secuencia inhibidora de JNK nativa" de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 o 143. En este contexto, los conceptos "nativa" o "secuencia(s) inhibidor(as) de JNK nativa(s)" se refieren a secuencias inhibidoras de JNK no alteradas de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 141 o 143, tal como se utilizan aquí, compuestas totalmente por L-aminoácidos.

5 Por consiguiente, la secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-X}_n^a\text{-RPTTLXLXXXXXXXXXQD-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-IB genérico (s)) [SEQ ID N°: 143] y/o el dominio de unión de JNK (JBD) de IB1 $\text{XRPTTLXLXXXXXXXXXQDS/TX}$ (L-IB (genérico)) [SEQ ID N°: 151]. En este contexto, cada X representa normalmente un residuo aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo aminoácido (nativo). X_n^a representa normalmente un residuo aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo aminoácido excepto serina o treonina, siendo n (el número de repeticiones de X) igual a 0 o 1. Además, cada X_n^b se puede seleccionar entre cualquier residuo aminoácido, siendo n (el número de repeticiones de X) igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más, con la condición de que si n (el número de repeticiones de X) es 0 para X_n^a , X_n^b preferentemente no comprende ninguna serina o treonina en su extremo C con el fin de evitar una serina o treonina en esta posición. Preferentemente, X_n^b representa un tramo contiguo de residuos peptídicos derivados de las SEQ ID N°: 141 o 143. X_n^a y X_n^b pueden representar D- o L-aminoácidos. Adicionalmente, la secuencia inhibidora de JNK tal como se utiliza aquí puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) seleccionada entre el grupo que comprende el dominio de unión de JNK de IB1 $\text{DTYRPKRPTTLNLFQVPR-SQDT}$ (L-IB1) [SEQ ID N°: 149]. De forma especialmente preferente, la secuencia inhibidora de JNK tal como se utiliza aquí puede comprender o consistir además en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) $\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH}$ (L-IB1(s)) [SEQ ID N°: 141]. Además, la secuencia inhibidora de JNK tal como se utiliza aquí puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) seleccionada entre el grupo que comprende el dominio de unión de JNK de IB1 L-IB1(s1) ($\text{NH}_2\text{-TLNLFQVPRSQD-COOH}$, SEQ ID N°: 153); LIB1(s2) ($\text{NH}_2\text{-TTLNLFQVPRSQ-COOH}$, SEQ ID N°: 154); L-IB1(s3) ($\text{NH}_2\text{-PTTLNLFQVPRS-COOH}$, SEQ ID N°: 155); L-IB1(s4) ($\text{NH}_2\text{-RPTTLNLFQVPR-COOH}$, SEQ ID N°: 156); L-IB1(s5) ($\text{NH}_2\text{-KRPTTLNLFQVPR-COOH}$, SEQ ID N°: 157); L-IB1(s6) ($\text{NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQV-COOH}$, SEQ ID N°: 158); L-IB1 (s7) ($\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 159); L-IB1(s8) ($\text{NH}_2\text{-LNLFPQVPRSQD-COOH}$, SEQ ID N°: 160); L-IB1(s9) ($\text{NH}_2\text{-TLNLFQVPRSQ-COOH}$, SEQ ID N°: 161); L-IB1(s10) ($\text{NH}_2\text{-TTLNLFQVPRS-COOH}$, SEQ ID N°: 162); L-IB1(s11) ($\text{NH}_2\text{-PTTLNLFQVPR-COOH}$, SEQ ID N°: 163); L-IB1(s12) ($\text{NH}_2\text{-RPTTLNLFQVP-COOH}$, SEQ ID N°: 164); L-IB1(s13) ($\text{NH}_2\text{-KRPTTLNLFQV-COOH}$, SEQ ID N°: 165); L-IB1(s14) ($\text{NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 166); L-IB1(s15) ($\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 167); L-IB1(s16) ($\text{NH}_2\text{-NLFQVPRSQD-COOH}$, SEQ ID N°: 168); L-IB1(s17) ($\text{NH}_2\text{-LNLFPQVPRSQ-COOH}$, SEQ ID N°: 169); L-IB1(s18) ($\text{NH}_2\text{-TLNLFQVPRS-COOH}$, SEQ ID N°: 170); L-IB1(s19) ($\text{NH}_2\text{-TTLNLFQVPR-COOH}$, SEQ ID N°: 171); L-IB1(s20) ($\text{NH}_2\text{-PTTLNLFQVP-COOH}$, SEQ ID N°: 172); L-IB1(s21) ($\text{NH}_2\text{-RPTTLNLFQV-COOH}$, SEQ ID N°: 173); L-IB1(s22) ($\text{NH}_2\text{-KRPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 174); L-IB1(s23) ($\text{NH}_2\text{-PKRPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 175); L-IB1(s24) ($\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLF-COOH}$, SEQ ID N°: 176); L-IB1(s25) ($\text{NH}_2\text{-LFPQVPRSQD-COOH}$, SEQ ID N°: 177); L-IB1(s26) ($\text{NH}_2\text{-NLFQVPRSQ-COOH}$, SEQ ID N°: 178); L-IB1(s27) ($\text{NH}_2\text{-LNLFPQVPRS-COOH}$, SEQ ID N°: 179); L-IB1(s28) ($\text{NH}_2\text{-TLNLFQVPR-COOH}$, SEQ ID N°: 180); L-IB1(s29) ($\text{NH}_2\text{-TTLNLFQVP-COOH}$, SEQ ID N°: 181); L-IB1(s30) ($\text{NH}_2\text{-PTTLNLFQV-COOH}$, SEQ ID N°: 182); L-IB1(s31) ($\text{NH}_2\text{-RPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 183); L-IB1(s32) ($\text{NH}_2\text{-KRPTTLNLFQ-COOH}$, SEQ ID N°: 184); L-IB1(s33) ($\text{NH}_2\text{-PKRPTTLNLF-COOH}$, SEQ ID N°: 185); y L-IB1(s34) ($\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLF-COOH}$, SEQ ID N°: 186).

45 Adicionalmente, la secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia de aminoácidos (nativa) seleccionada entre el grupo que comprende el dominio de unión de JNK (largo) de IB1 $\text{PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT}$ (IB1-largo) [SEQ ID N°: 145], el dominio de unión de JNK (largo) de IB2 $\text{IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS}$ (IB2-largo) [SEQ ID N°: 146], el dominio de unión de JNK de c-Jun $\text{GAYGYSNPKILKQSM TNLADPVG N LKPH}$ (c-Jun) [SEQ ID N°: 147], dominio de unión de JNK de ATF2 $\text{TNEDHLAVHKHKHEMTLKF GPAR NDSVIV}$ (ATF2) [SEQ ID N°: 148]). En este contexto, una alineación reveló una secuencia de 8 aminoácidos parcialmente conservada y otra comparación de los JBD de IB1 e IB2 reveló dos bloques de siete y tres aminoácidos que están altamente conservados entre las dos secuencias.

55 De acuerdo con otra realización preferente, la secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede estar compuesta en parte o exclusivamente por D-aminoácidos tal como se definen más arriba. De forma especialmente preferente, estas secuencias inhibidoras de JNK compuestas por D-aminoácidos son secuencias D retroinversas no nativas de las secuencias inhibidoras de JNK (nativas) arriba mencionadas. El concepto "secuencias retroinversas" se refiere a un isómero de una secuencia de péptidos lineal donde la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo aminoácido está invertida (véase, por ejemplo, Jameson y col., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady y col., Nature, 368, 692-693 (1994)). La ventaja de combinar D-enantiómeros y síntesis inversa consiste en que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace de amida se

intercambian, mientras que la posición de los grupos de la cadena lateral en cada carbono alfa se conserva. A no ser que se indique específicamente otra cosa, se supone que cualquier secuencia de L-aminoácidos o un péptido dado tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención se puede convertir en una secuencia o un péptido D retroinversos sintetizando una inversión de la secuencia o el péptido para la

5

Por consiguiente, la secuencia inhibidora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia D retroinversa de acuerdo con la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-DQXXXXXXXXLXLTTPR-X}_n^a\text{-X}_n^b\text{-COOH}$ (D-IB1 genérico (s)) [SEQ ID N°: 144] y/o $\text{XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX}$ (D-IB (genérico)) [SEQ ID N°: 152]. Tal como se utilizan en este contexto, X, X_n^a y X_n^b son como se ha definido más arriba (preferentemente representando D-aminoácidos), representando X_n^b preferiblemente un tramo contiguo de residuos derivados de SEQ ID N°: 142 o 144. Adicionalmente, las secuencias inhibidoras de JNK tal como se utilizan aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia D retroinversa de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio de unión de JNK (JBD) de IB1 TDQSRPVQPFLNLTTPRKPRYTD (D-IB1) [SEQ ID N°: 150]. De forma especialmente preferente, las secuencias inhibidoras de JNK tal como se utilizan aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia D retroinversa de acuerdo con la secuencia de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLNLTTPRKPR-COOH}$ (D-IB1(s)) [SEQ ID N°: 142]. Además, las secuencias inhibidoras de JNK tal como se utilizan aquí pueden comprender o consistir en al menos una secuencia D retroinversa de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio de unión de JNK (JBD) de IB1 D-IB1(s1) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 187); D-IB1(s2) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 188); D-IB1(s3) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTPRK-COOH}$, SEQ ID N°: 189); D-IB1(s4) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTPR-COOH}$, SEQ ID N°: 190); D-IB1(s5) ($\text{NH}_2\text{-SRPVQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 191); D-IB1(s6) ($\text{NH}_2\text{-QSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 192); D-IB1(s7) ($\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 193); D-IB1(s8) ($\text{NH}_2\text{-PFLNLTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 194); D-IB1(s9) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 195); D-IB1(s10) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTPRK-COOH}$, SEQ ID N°: 196); D-IB1(s11) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTPR-COOH}$, SEQ ID N°: 197); D-IB1(s12) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 198); D-IB1(s13) ($\text{NH}_2\text{-SRPVQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 199); D-IB1(s14) ($\text{NH}_2\text{-QSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 200); D-IB1(s15) ($\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 201); D-IB1(s16) ($\text{NH}_2\text{-FLNLTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 202); D-IB1(s17) ($\text{NH}_2\text{-PFLNLT-TPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 203); D-IB1(s18) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTPRK-COOH}$, SEQ ID N°: 204); D-IB1(s19) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTPR-COOH}$, SEQ ID N°: 205); D-IB1(s20) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 206); D-IB1(s21) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 207); D-IB1(s22) ($\text{NH}_2\text{-SRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 208); D-IB1(s23) ($\text{NH}_2\text{-QSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 209); D-IB1(s24) ($\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 210); D-IB1(s25) ($\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLCOOH}$, SEQ ID N°: 211); D-IB1(s26) ($\text{NH}_2\text{-QSRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 212); D-IB1 (s27) ($\text{NH}_2\text{-SRPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 213); D-IB1(s28) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLT-COOH}$, SEQ ID N°: 214); D-IB1(s29) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 215); D-IB1(s30) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTTP-COOH}$, SEQ ID N°: 216); D-IB1(s31) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTTPR-COOH}$, SEQ ID N°: 217); D-IB1(s32) ($\text{NH}_2\text{-PFLNLTTPRK-COOH}$, SEQ ID N°: 218); D-IB1(s33) ($\text{NH}_2\text{-FLNLTTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 219); y D-IB1(s34) ($\text{NH}_2\text{-LNLTPRKPR-COOH}$, SEQ ID N°: 220).

40 En la Tabla 4 se muestran ejemplos de secuencias inhibidoras de JNK adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención (SEQ ID N°: 141 a 220). La tabla muestra el nombre de las secuencias inhibidoras de JNK tal como se utilizan aquí, así como su número identificador de secuencia, su longitud y su secuencia de aminoácidos. Además, la Tabla 4 muestra secuencias derivadas de IB1 y también sus fórmulas genéricas, por ejemplo para las SEQ ID N°: 141 y 142 y las SEQ ID N°: 143 y 45 144, respectivamente. La Tabla 4 indica además secuencias de L-IB1 de acuerdo con las SEQ ID N°: 153 a 186 y las secuencias de D-IB1 SEQ ID N°: 187 a 220.

50

55

60

Tabla 4

SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
L-IB1(s)	141	19	RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
D-IB1(s)	142	19	DQSRPVQPFLNLTTPRKPR (NH ₂ -DQSRPVQPFLNLTTPRKPR-COOH)
L-IB (generic) (s)	143	19	NH ₂ -X _n ^b -X _n ^a -RPTTLXLLLLXXXXXQD-X _n ^b -COOH
D-IB (generic) (s)	144	19	NH ₂ -X _n ^b -DQXXXXXXXXLXLTTPR-X _n ^a -X _n ^b -COOH
IB1-long	145	29	PGTGCGDTPRKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ - PGTGCGDTPRKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
IB2-long	146	27	IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS (NH ₂ - IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS -COOH)
c-Jun	147	29	GAYGYSNPKILKQSMTLNADPVGNLKPH (NH ₂ - GAYGYSNPKILKQSMTLNADPVGNLKPH -COOH)
ATF2	148	29	TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGRANDSVIV (NH ₂ - TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGRANDSVIV -COOH)
L-IB1	149	23	DTYRKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ - DTYRKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
D-IB1	150	23	TDQSRPVQPFLNLTTPRKPRYTD (NH ₂ - TDQSRPVQPFLNLTTPRKPRYTD -COOH)
L-IB (generic)	151	19	XRPTTLXLLLLXXXXXQDS/TX (NH ₂ - XRPTTLXLLLLXXXXXQDS/TX -COOH)
D-IB (generic)	152	19	XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX (NH ₂ - XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX -COOH)
L-IB1(s1)	153	13	TLNLFQVPRSQD

ES 2 602 785 T3

			(NH ₂ -TLNLFQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s2)	154	13	TTLNLFQVPRSQ (NH ₂ -TTLNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s3)	155	13	PTTLNLFQVPRS (NH ₂ -PTTLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s4)	156	13	RPTTLNLFQVPR (NH ₂ -RPTTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s5)	157	13	KRPTTLNLFQVP (NH ₂ -KRPTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1 (s6)	158	13	PKRPTTLNLFQV (NH ₂ -PKRPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1 (s7)	159	13	RPKRPTTLNLFQ (NH ₂ -RPKRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1 (s8)	160	12	LNLFQVPRSQD (NH ₂ -LNLFQVPRSQD-COOH)
L-IB1 (s9)	161	12	TLNLFQVPRSQ (NH ₂ -TLNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1 (s10)	162	12	TTLNLFQVPRS (NH ₂ -TTLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s11)	163	12	PTTLNLFQVPR (NH ₂ -PTTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s12)	164	12	RPTTLNLFQVP (NH ₂ -RPTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s13)	165	12	KRPTTLNLFQV (NH ₂ -KRPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s14)	166	12	PKRPTTLNLFQ (NH ₂ -PKRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s15)	167	12	RPKRPTTLNLF (NH ₂ -RPKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1 (s16)	168	11	NLFQVPRSQD (NH ₂ -NLFQVPRSQD-COOH)
L-IB1 (s17)	169	11	LNLFQVPRSQ (NH ₂ -LNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1 (s18)	170	11	TLNLFQVPRS (NH ₂ -TLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1 (s19)	171	11	TTLNLFQVPR (NH ₂ -TTLNLFQVPR-COOH)
L-181 (s20)	172	11	PTTLNLFQVP (NH ₂ -PTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1 (s21)	173	11	RPTTLNLFQV (NH ₂ -RPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s22)	174	11	KRPTTLNLFQ (NH ₂ -KRPTTLNLFQ-COOH)

ES 2 602 785 T3

L-IB1 (s23)	175	11	PKRPTTLNLF (NH ₂ -PKRPTTLNLF-COOH)
L-1B1 (s24)	176	11	RPKRPTTLNLF (NH ₂ -RPKRPTTLNLF-COOH)
L-1B1 (s25)	177	10	LFPQVPRSQD (NH ₂ -LFPQVPRSQD-COOH)
L-1B1 (s26)	178	10	NLFPQVPRSQ (NH ₂ -NLFPQVPRSQ-COOH)
L-IB1 (s27)	179	10	LNLFPQVPRS (NH ₂ -LNLFPQVPRS-COOH)
L-IB1 (s28)	180	10	TLNLFQVPR (N H ₂ -TLNLFQVPR-COOH)
L-IB1 (s29)	181	10	TTLNLFQVP (NH ₂ -TTLNLFQVP-COOH)
L-IB1 (s30)	182	10	PTTLNLFQV (NH ₂ -PTTLNLFQV-COOH)
L-IB1 (s31)	183	10	RPTTLNLFQ (NH ₂ -RPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1 (s32)	184	10	KRPTTLNLF (NH ₂ -KRPTTLNLF-COOH)
L-IB1 (s33)	185	10	PKRPTTLNLF (NH ₂ -PKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1 (s34)	186	10	RPKRPTTLNL (NH ₂ -RPKRPTTLNL-COOH)
D-IB1 (s1)	187	13	QPFLNLTTPRKPR (NH ₂ -QPFLNLTTPRKPR-COOH)
D-IB1 (s2)	188	13	VQPFLNLTTPRK (NH ₂ -VQPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1 (s3)	189	13	PVQPFLNLTTPRK (NH ₂ -PVQPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1 (s4)	190	13	RPVQPFLNLTTPR (NH ₂ -RPVQPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1 (s5)	191	13	SRPVQPFLNLTTP (NH ₂ -SRPVQPFLNLTTP-COOH)
D-IB1 (s6)	192	13	QSRPVQPFLNLT (NH ₂ -QSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1 (s7)	193	13	DQSRPVQPFLNLT (NH ₂ -DQSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1 (s8)	194	12	PFLNLTTPRKPR (NH ₂ -PFLNLTTPRKPR-COOH)
D-IB1 (s9)	195	12	QPFLNLTTPRK (NH ₂ -QPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1 (s10)	196	12	VQPFLNLTTPRK

ES 2 602 785 T3

			(NH ₂ -VQPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1 (s11)	197	12	PVQPFLNLTTPR (NH ₂ -PVQPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1 (s12)	198	12	RPVQPFLNLTT (NH ₂ -RPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1 (s13)	199	12	SRPVQPFLNLTT (NH ₂ -SRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1 (s14)	200	12	QSRPVQPFLNLT (NH ₂ -QSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1 (s15)	201	12	DQSRPVQPFLNL (NH ₂ -DQSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1 (s16)	202	11	FLNLTTPRKPR (NH ₂ -FLNLTTPRKPR-COOH)
D-IB1 (s17)	203	11	PFLNLTTPRKP (NH ₂ -PFLNLTTPRKP-COOH)
D-IB1 (s18)	204	11	QPFLNLTTPRK (NH ₂ -QPFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1 (s19)	205	11	VQPFLNLTTPR (NH ₂ -VQPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1 (s20)	206	11	PVQPFLNLTT (NH ₂ -PVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1 (s21)	207	11	RPVQPFLNLTT (NH ₂ -RPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1 (s22)	208	11	SRPVQPFLNLT (NH ₂ -SRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1 (s23)	209	11	QSRPVQPFLNL (NH ₂ -QSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1 (s24)	210	11	DQSRPVQPFLN (NH ₂ -DQSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1 (s25)	211	10	DQSRPVQPFL (NH ₂ -DQSRPVQPFL-COOH)
D-IB1 (s26)	212	10	QSRPVQPFLN (NH ₂ -QSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1 (s27)	213	10	SRPVQPFLNL (NH ₂ -SRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1 (s28)	214	10	RPVQPFLNLT (NH ₂ -RPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1 (s29)	215	10	PVQPFLNLTT (NH ₂ -PVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1 (s30)	216	10	VQPFLNLTT (NH ₂ -VQPFLNLTT-COOH)
D-IB1 (s31)	217	10	QPFLNLTTPR (NH ₂ -QPFLNLTTPR-COOH)

D-IB1 (s32)	218	10	PFLNLTTPRK (NH ₂ -PFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1 (s33)	219	10	FLNLTTPRKP (NH ₂ -FLNLTTPRKP-COOH)
D-IB1 (s34)	220	10	LNLTTPRKPR (NH ₂ -LNLTTPRKPR-COOH)

5 Las secuencias inhibitoras de JNK adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención pueden comprender o consistir además en al menos una variante, fragmento y/o derivado de las secuencias de aminoácidos nativas o no nativas arriba definidas de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220. Preferentemente, estas variantes, fragmentos y/o derivados conservan la actividad biológica de las secuencias inhibitoras de JNK nativas o no nativas tal como se utilizan aquí dadas a conocer más arriba, en particular de las secuencias de aminoácidos nativas o no nativas de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220, es decir, que se unen a JNK y/o inhiben la activación de al menos un factor de transcripción activado por JNK, por ejemplo c-Jun, ATF2 o Elk1. La funcionalidad se puede analizar mediante diversas pruebas, por ejemplo ensayos de unión del péptido con su molécula diana, o por métodos biofísicos, por ejemplo espectroscopía, modelización por ordenador, análisis estructural, etc. En particular, una secuencia inhibitora de JNK o variantes, fragmentos y/o derivados de la misma tal como se definen más arriba se pueden analizar mediante análisis del carácter hidrófilo (véase, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3824-3828), que puede ser utilizado para identificar las regiones hidrófobas e hidrófilas de los péptidos, ayudando así en el diseño de sustratos para la manipulación experimental, como en experimentos de unión, o para la síntesis de anticuerpos. También se puede llevar a cabo un análisis estructural secundario para identificar regiones de una secuencia inhibitora de JNK o de variantes, fragmentos y/o derivados de la misma tal como se utilizan aquí que adoptan motivos estructurales específicos (véase, por ejemplo, Chou y Fasman, 1974, Biochem 13: 222-223). Las operaciones de manipulación, traducción, predicción de estructura secundaria, perfiles de carácter hidrófilo e hidrófobo, predicción y representación gráfica de marcos de lectura abiertos, y determinación de homologías de secuencia se pueden llevar a cabo utilizando programas de *software* de ordenador disponibles en la técnica. También se pueden utilizar otros métodos de análisis estructural, incluyendo, por ejemplo, cristalografía de rayos X (véase, por ejemplo, Engstrom, 1974. Biochem Exp Biol 11:7-13), espectroscopía de masas y cromatografía de gas (véase, por ejemplo, METHODS IN PROTEIN SCIENCE, 1997, J. Wiley and Sons, New York, NY) y modelización por ordenador (véase, por ejemplo, Fletterick y Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, En: CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Por consiguiente, la secuencia inhibitora de JNK adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en al menos una variante de secuencias de aminoácidos (nativas o no nativas) de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220. En el contexto de la presente invención, una "variante de una secuencia de aminoácidos (nativa o no nativa) de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220" preferentemente es una secuencia derivada de cualquiera de las secuencias de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220, comprendiendo la variante alteraciones de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220. Estas alteraciones comprenden normalmente 1 a 20, preferentemente 1 a 10 y de forma especialmente preferente 1 a 5 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220, presentando la variante una identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220 de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o incluso 99%. Si las variantes de secuencias de aminoácidos (nativas o no nativas) de acuerdo con las SEQ ID N°: 141 a 220 tal como se definen más arriba y como se utilizan aquí se obtienen por sustitución de aminoácidos específicos, estas sustituciones preferiblemente son sustituciones de aminoácidos conservativas tal como ya se ha definido más arriba.

45 Las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar además entre antígenos, preferentemente antígenos de proteína y péptido, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos de alergia, autoantígenos autoinmunes, antígenos patógenos y antígenos de virus, preferentemente de citomegalovirus (CMV), virus de orthopox variola, virus de orthopox alastrim, virus de parapox ovis, virus molluscum contagiosum, virus de herpes simplex 1, virus de herpes simplex 2, virus de herpes B, virus varicela zóster, virus de la pseudorrabia, virus citomegálico humano, virus de herpes humano 6, virus de herpes humano 7, virus de Epstein-Barr, virus de herpes humano 8, virus de la hepatitis B, virus de chikungunya, virus de O'nyong'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus GB C, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del mal de Louping, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis B de Japón, virus Powassan, virus FSME, 55 SARS, virus corona asociado con SARS, virus corona humano 229E, virus corona humano Oc43, Torovirus,

virus linfotrópico de células T humano de tipo I, virus linfotrópico de células T humano de tipo II, VIH (SIDA), es decir, virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 o virus de inmunodeficiencia humana de tipo 2, virus de la gripe, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Tacaribe, virus Junin, virus Machupo, virus de la enfermedad de Borna, virus Bunyamwera, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la fiebre del mosquito simúlido, virus Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Hazara, virus Khasan, virus Hantaan, virus Seoul, virus Prospect Hill, virus Puumala, virus Dobrava Belgrade, virus Tula, virus sin nombre, virus Marburg del lago Victoria, virus del Ébola del Zaire, virus del Ébola del Sudan, virus del Ébola de Costa de Marfil, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus de la influenza C, virus de la parainfluenza, virus de la malaria, virus Marburg, virus del sarampión, virus de las paperas, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano, virus Indiana de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus Mokola, virus Duvenhage, lyssavirus de murciélago europeo 1 + 2, lyssavirus de murciélago australiano, adenovirus A-F, virus del papiloma humano, virus del condiloma 6, virus del condiloma 11, poliomavirus, virus adenoasociados 2, rotavirus, orbivirus, varicela incluyendo varizela zóster, etc., o antígenos de leishmaniosis, tripanosomas, amibas, bacterias, etc., o se pueden seleccionar entre variantes de los antígenos arriba mencionados. Preferentemente, los fragmentos y variantes de antígenos tal como se definen más arriba presentan una homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80% o aproximadamente un 90% con uno de los antígenos o secuencias de antígenos tal como se muestran o describen más arriba. En este contexto, la definición de fragmentos y variantes es aplicable similarmente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Además, aquí se describen epítopos (también denominados "determinantes antigénicos") de antígenos o fragmentos antigénicos tal como se definen más arriba. En el contexto de la presente invención, los epítopos son normalmente fragmentos localizados sobre la superficie exterior de antígenos de proteína o péptido (nativos) tal como se definen aquí, que preferentemente tienen 5 a 15 aminoácidos, de forma especialmente preferente 5 a 12 aminoácidos, de forma incluso más preferente de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos, es decir, en su forma nativa.

Además, las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar entre anticuerpos. De acuerdo con la presente invención, estos anticuerpos se pueden seleccionar entre cualquier anticuerpo, por ejemplo cualquier anticuerpo natural o producido de forma recombinante, conocido en la técnica, en particular anticuerpos adecuados para fines terapéuticos, diagnósticos o científicos, o anticuerpos que han sido identificados en relación con enfermedades cancerosas específicas. Aquí, el término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales y policlonales (incluyendo agonistas, antagonistas y anticuerpos bloqueantes o neutralizantes) y especies de anticuerpos con especificidad poliepitópica. De acuerdo con la invención, el concepto "anticuerpo" normalmente incluye cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo anticuerpos de IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), como anticuerpos naturales, anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped, anticuerpos que han sido aislados e identificados a partir de anticuerpos naturales o anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped y producidos de forma recombinante mediante métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, humanos, humanizados, biespecíficos, intracuerpos, es decir anticuerpos expresados en células y opcionalmente localizados en compartimentos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos arriba mencionados. En general, un anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada que tienen dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal, V_L , y un dominio constante C-terminal, C_L . En cambio, la cadena pesada del anticuerpo de IgG, por ejemplo, consiste en un dominio variable N-terminal, V_H , y tres dominios constantes, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . En este contexto, los anticuerpos también comprenden fragmentos y variantes de anticuerpos tal como se describen más arriba, por ejemplo un fragmento F_{ab} , un fragmento F_c , etc. Preferentemente, estos fragmentos y variantes presentan una homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80% o aproximadamente un 90% con uno de los anticuerpos arriba descritos. En este contexto, la definición de fragmentos y variantes es aplicable similarmente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.

Adicionalmente, las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar entre factores apoptóticos, incluyendo AIF, Apaf, por ejemplo Apaf-1, Apaf-2, Apaf-3, o APO-2 (L), APO-3 (L), Apopain, Bad, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xs, bik, Bok, CAD, Calpain, Caspasa e.g. Caspasa-1, Caspasa-2, Caspasa-3, Caspasa-4, Caspasa-5, Caspasa-6, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Caspasa-10, Caspasa-11, ced-3, ced-9, c-Jun, c-Myc, crm A, citocromo C, CdR1, DcR1, DD, DED, DISC, DNA-PKcs, DR3, DR4, DR5, FADD/MORT-1, FAK, Fas (Fas-ligando CD95/fas (receptor)), FLICE/MACH, FLIP, fodrin, fos, G-Actin, Gas-2, gelsolina, granzime A/B, ICAD, ICE, JNK, lamina A/B, MAP, Max, MCL-1, Mdm-2, MEKK-1, MORT-1, Myd88, NEDD, NF-kappaB, NuMa,

p38, p53, PAK-2, PARP, perforina, PITSLRE, PKCdelta, pRb, presenilina, prICE, RAIDD, Ras, RIP, esfingomielinasa, timidinaquinasa de herpes simplex, TRADD, TRAF2, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, transglutaminasa, etc., o entre fragmentos o variantes de los mismos, o entre componentes de la vía de señales wnt, como β -catenina, o la familia ICF, quinasas de tipo polo, CiP2A, PP2A, etc., o entre fragmentos o variantes de los mismos. Preferentemente, estos fragmentos y variantes presentan una homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80% o aproximadamente un 90% con una de las secuencias mostradas o descritas más arriba. En este contexto, la definición de fragmentos y variantes es aplicable similarmente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.

Las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar además entre al menos una o más proteínas de dominio BH3 de longitud parcial o completa y/o al menos una proteína solo-BH3 de longitud parcial o completa. En este contexto, las proteínas solo-BH3 se definen preferentemente como miembros de la familia Bcl-2 que representan reguladores de apoptosis mediante la interacción con otros miembros de la familia Bcl-2. Por tanto, en el contexto de la presente invención, el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se puede seleccionar entre una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una o más secuencias de dominio BH3 de longitud parcial o completa de una proteína solo-BH3 o una proteína solo-BH3 de longitud parcial o completa (definida como una subclase de las proteínas de la familia Bcl-2), que son capaces de inducir la apoptosis bien interactuando con al menos una proteína de la familia Bcl-2, bien activando o sensibilizando al menos un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2. Su actividad funcional se puede analizar mediante métodos de ensayo adecuados, por ejemplo con ensayos de unión o ensayando su actividad proapoptótica en ensayos de apoptosis. Preferentemente, una secuencia de aminoácidos utilizada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia de dominio BH3 de longitud parcial o completa y/o al menos una secuencia de proteínas solo-BH3 de longitud parcial o completa seleccionada entre el grupo consistente en Bid, Bad, Noxa, Puma, Bim, Bik, Bmf, DP5 / Hrk y Bok. Alternativamente, una secuencia de aminoácidos utilizada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en una combinación de al menos una secuencia de dominio BH3 de longitud parcial o completa y/o al menos una secuencia de proteínas solo-BH3 de longitud parcial o completa, seleccionándose las combinaciones preferentemente entre el grupo consistente en, por ejemplo, Bid y Bad, Bim y Bad, Bik y Bad, Puma y Bad, Noxa y Bad, Bmf y Bad, DP5 / Hrk y Bad, Bok y Bad, Bik y Bim, Bik y Bid, Bik y Puma, Bik y Noxa, Bik y Bmf, Bik y DP5 / Hrk, Bik y Bok, Bid y Puma, Bid y Noxa, Bid y Bim, Bid y Bmf, Bid y DP5 / Hrk, Bid y Bok, Bim y Noxa, Bim y Puma, Bim y Bmf, Bim y DP5 / Hrk, Bim y Bok, Puma y Noxa, Puma y Bmf, Puma y DP5 / Hrk, Puma y Bok, Noxa y Bmf, Noxa y DP5 / Hrk y Noxa y Bok. Las secuencias BH3 o secuencias de proteínas solo-BH3 (de longitud parcial o completa) arriba definidas se pueden seleccionar, por ejemplo, entre cualquier proteína solo-BH3 de mamífero, en particular entre las isoformas humanas. Así, el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia de dominio BH3 de longitud parcial o completa y/o al menos una secuencia de proteínas solo-BH3 tal como se define mediante cualquiera de las SEQ ID N°: 221 a 237 (véase la Tabla 5). Preferentemente, una secuencia de aminoácidos utilizada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender o consistir además en al menos un fragmento o variante de al menos una secuencia de dominio BH3 de longitud parcial o completa y/o al menos una secuencia de proteínas solo-BH3 tal como se define mediante cualquiera de las SEQ ID N°: 221 a 237. Estos fragmentos y variantes tienen preferentemente una longitud de secuencia de menos de 50, preferiblemente menos de 40 y de forma especialmente preferente menos de 30 aminoácidos, o presentan una homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80% o aproximadamente un 90% con una de las secuencias arriba descritas o tal como se muestran en cualquiera de las SEQ ID N°: 221 a 237. En este contexto, la definición de fragmentos y variantes es aplicable similarmente tal como se define más arriba en relación con el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Además, los fragmentos o variantes de las secuencias nativas comprenden normalmente una secuencia de dominio BH3 o comprenden al menos en parte una secuencia de dominio BH3 (al menos 7 aminoácidos de la secuencia de dominio BH3).

Tabla 5

SECUENCIA /PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
Bid (human) (transcript variant 1)	221	241	MCSGAGVMMA RWAARGRAGW RSTVRILSPL GHCEPGVSRS CRAAQAMDCE VNNGSSLRDE CITNLLVFGF LQSCSDNSFR RELDALGHEL PVLAPQWEGY DELQTDGNRS SHSRLGRIEA DSEQEDIIR NIARHLAQVG DSMDRSIPPG LVNGLALQLR
			NTSRSEEDRN RDLATALEQL LQAYPRDMEK EKTMLVLALL LAKKVASHTP SLLRDVFHTT VNFINONLRT YVRSLARNGM D
Bad (human)	222	168	MFQIPEFEPs EQEDSSSAER GLGSPAGDG PSGSGKHHRQ APGLLDWASH QQEQPTSSSH HGGAGAVEIR SRHSSYPAGT EDDEGMGEEP SPFRGRSRS PPNLWAAQRY GRELRMSDE FVDSFKKGLP RPKSAGTATQ MRQSSSWTRV FQSWWDRNLG RGSSAPSQ
Noxa1 (human)	223	483	MASLGDLVRA WHLGAQAVDR GDWARALHLF SGVPAPPARL CFNAGCVHLL AGDPEAALRA FDQAVTKDTC MAVGFFQRGV ANFQLARFQE ALSDFWLAE QLRGHAAIDY TQLGLRFLKQ AWEVLHNVAS AQCQLGLWTE AASSLREAMS KWPEGSLNGL DSALDQVQRR GSLPPRQVPR GEVFRPHRWH LKHLEPVDLF GKAKVVASAI PDDQGWGVRP QQPQGPANH DARSLIMDSP RAGTHQGPLD AETEVGADRC TSTAYQEQRQ QVEQVGKQAP LSPGLPAMGG PGPGCEDPA GAGGAGAGGS EPLVTVTVQC AFTVALRARR GADLSSLRAL LGQALPHQAQ LGQLSYLAPG EDGHWWPIPE EESLQRAWQD AAACPRGLQL QCRGAGGRPV LYQVVAQHSY SAQGPEDLGF RQGDVTDVLC EEPDVPLAVD QAWLEGHCDG RIGIFPKCFV VPAGPRMSG A PGRLPRSQQG DQP

Puma (human)	224	193	MARARQEGSS PEPVEGLARD GPRPFPLGRL VPSAVSCGLC EPGLAAAPAA PTLPAAYLC APTAPPVTA ALGGSRWPGG PRSRPRGPRP DGQPQSLSLA EQHLESPVPS APGALAGGPT QAAPGVRGEE EQWAREIGAQ LRRMADDLNA QYERRRQEEQ QRHRPSPWRV LYNLIMGLLP LPRGHRAPEM EPN
Bim (human) (transcript variant 1)	225	198	MAKQPSDVSS ECDREGRQLQ PAERPPQLRP GAPTSLQTEP QGNPEGNHGG EGDSCPHGSP QGPLAPPASP GPFATRSPLF IFMRRSLLS RSSSGYFSFD TDRSPAMSC DKSTQTPSPP CQAFNHLYSA MASMRAEPA DMRPEIWIAQ ELRRIGDEFN AYYARRVFLN NYQAAEDHPR MVILRLLRYI VRLVWRMH
Bik (human)	226	160	MSEVRPLSRD ILMETLLYEQ LLEPPTMEVL GMTDSEEDLD PMEDFDSLEC MEGSDALALR LACIGDEMDV SLRAPRLAQL SEVAMHSLGL AFIYDQTEDI RDVLRSEFMDG FTTLKENIMR FWRSPNPGSW VSCEQVLLAL LLLLALLPL LSGGLHLLK
BH3-domain of Bik (Bik BH3)	227	18	ALALRLACIG DEMDVSLR
BH3-domain of Bad (Bad BH3)	228	18	RYGRELRRMS DEFVDSFK
BH3-domain of Bid (Bid BH3)	229	18	NIARHLAQVG DSMDRSIP
BH3-domain of Bmf (Bmf BH3)	230	18	QIARKLQCIA DQFHRLHV
BH3-domain of DP5/Hrk (DP5Hrk BH3)	231	18	LTAARLKAIG DELHQRTM
BH3-domain of Bim (Bim BH3)	232	18	WIAQELRRIG DEFNAYYA
BH3-domain of Noxa (Noxa BH3)	233	18	ECATQLRRFG DKLNFRQK
BH3-domain of PUMA (PUMA BH3)	234	18	EIGAQLRRMA DDLNAQYE
BH3-domain of Bax (Bax BH3)	235	18	KLSECLKRIG DELDSNME
BH3-domain of Bak (Bak BH3)	236	18	QVGRQLAIIG DDINRRYD
BH3-domain of Bok (Bok BH3)	237	18	EVCTVLLRLG DELEQIRP

5 Las secuencias de proteínas o péptidos tal como se describen más arriba, por ejemplo de proteínas terapéuticamente activas, antígenos, anticuerpos, factores apoptóticos, proteasas implicadas en estados patológicos, preferentemente inhibidores de proteasas peptídicas, dominios BH3, etc., utilizadas como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden proporcionar como una secuencia de proteínas o péptidos en la forma nativa compuesta por L-aminoácidos o en la forma D retroinversa compuesta (totalmente) por D-aminoácidos, que significa que estas

secuencias se han invertido mediante la inversión de sus extremos: el extremo C nativo es el extremo N de la forma invertida y el extremo N nativo es el extremo C de la forma invertida. Alternativamente, estas secuencias de proteínas o péptidos tal como se describen más arriba pueden proporcionar su secuencia de proteínas o péptidos en forma de una mezcla de L-aminoácidos y D-aminoácidos.

- 5 Adicionalmente, las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se puede seleccionar entre ácidos nucleicos que codifican las proteínas o péptidos arriba definidos, como proteínas y péptidos terapéuticamente activos, antígenos, anticuerpos, factores apoptóticos, proteasas implicadas en estados patológicos, preferentemente inhibidores de proteasas peptídicas, dominios BH3 o proteínas solo-BH3 de longitud parcial o completa, o sus variantes o fragmentos.
- 10 En este contexto, los ácidos nucleicos preferentemente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios, bicatenarios o parcialmente bicatenarios, preferentemente seleccionados entre ADN genómico, ADNc, ARN, ARNip, ADN antisentido, ARN antisentido, ribozima, secuencias de ARN/ADN complementarias con o sin elementos de expresión, un minigén, fragmentos de genes, elementos reguladores, promotores y combinaciones de los mismos.
- 15 En un ejemplo particular, las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar entre ARNip. En este contexto, un ARNip resulta interesante en particular en relación con el fenómeno de la interferencia de ARN. El fenómeno de la interferencia de ARN llamó la atención en el curso de investigaciones inmunológicas. En los últimos años se ha descubierto un mecanismo de defensa basado en ARN, que existe tanto en el reino de los hongos como en el reino vegetal y animal y actúa como un "sistema inmunológico del genoma". El sistema se describió en un principio en diversas especies independientemente entre sí, primero en *C. elegans*, antes de que fuera posible identificar que los mecanismos subyacentes del proceso son idénticos: la resistencia a los virus mediada por ARN en plantas, el PTGS (silenciamiento génico postranscripcional) en plantas y la interferencia de ARN en organismos eucariotas se basan por tanto en un procedimiento común. La técnica de interferencia de ARN (iARN) *in vitro* se basa en moléculas de ARN bicatenarias (ARNbc) que desencadenan la supresión específica de secuencia de la expresión génica (Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002) Nature 41: 244-251). En la transfección de células de mamífero con ARNbc largo, la activación de la proteína quinasa R y RnasaL provoca efectos inespecíficos, por ejemplo una respuesta al interferón (Stark y col. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He y Katze (2002) Viral Immunol. 15: 95-119). Estos efectos inespecíficos se evitan si se utiliza ARN más corto, por ejemplo 21- a 23-mero, denominado ARNip (ARN interferente pequeño), ya que un ARNip más corto de 30 pb no desencadena efectos inespecíficos (Elbashir y col. (2001) Nature 411: 494-498). Recientemente también se han utilizado moléculas de ARNbc *in vivo* (McCaffrey y col. (2002), Nature 418: 38-39; Xia y col. (2002), Nature Biotech. 20: 1006-1010; Brummelkamp y col. (2002), Cancer Cell 2: 243-247). Por tanto, un ARNip utilizado como molécula efectora adecuada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención comprende normalmente una secuencia de ARN de cadena (simple o) doble, preferentemente de cadena doble, con aproximadamente 8 a 30 nucleótidos, preferentemente 17 a 25 nucleótidos, de forma especialmente preferente 20 a 25 nucleótidos y de forma totalmente preferente 21 a 23 nucleótidos. En principio, todas las secciones que tienen una longitud de 17 a 29, preferentemente de 19 a 25 y de forma totalmente preferente 21 a 23 pares de bases presentes en la región codificadora de una (secuencia de) proteína tal como se menciona más arriba pueden servir como secuencia diana para un ARNip. Del mismo modo, los ARNip también se pueden dirigir contra secuencias de nucleótidos de una (secuencia de) proteína descrita más arriba que no se encuentran en la región codificadora, en particular en la región no codificadora 5' del ARN, por ejemplo, por tanto, contra regiones no codificadoras del ARN que tienen una función reguladora. Así, la secuencia diana del ARNip se puede encontrar en la región traducida y/o no traducida del ARN y/o en la región de los elementos de control. La secuencia diana de un ARNip también se puede encontrar en la región de solapamiento de una secuencia no traducida y traducida; en particular, la secuencia diana puede comprender al menos un nucleótido en dirección 5' desde el triplete de inicio de la región codificadora.
- 50 En otro ejemplo particular, las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar entre ARN antisentido. En este contexto, un ARN antisentido consiste preferentemente en una molécula de ARN (monocatenario) transcrita en base a la cadena codificadora, más que la cadena plantilla, de ADN (genómico), de modo que es complementario al ARN efector (mensajero). Un ARN antisentido adecuado como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención forma normalmente un híbrido entre las moléculas de ARN efector y antisentido y, por tanto, puede bloquear la traducción del ARNm correspondiente. Un ARN antisentido tal como se utiliza aquí se puede dirigir contra cualquier porción de una secuencia de ARNm, por ejemplo derivada de ADN genómico y/o que puede codificar cualquier proteína, por ejemplo un péptido de proteína tal como se define aquí, tal como proteínas y péptidos terapéuticamente activos, antígenos, anticuerpos, factores apoptóticos, proteasas implicadas en estados patológicos, preferentemente inhibidores de proteasas peptídicas, dominios BH3 o proteínas solo-BH3 de longitud parcial o completa, o sus variantes o

fragmentos tal como se han descrito más arriba, si así se reduce/suprime la traducción de la proteína o el péptido codificados. Por consiguiente, la secuencia diana del ARN antisentido en el ARNm diana (o el ADN (genómico) diana) puede estar situada en la región traducida y/o no traducida del ARNm (el ADN (genómico) diana), por ejemplo en la región de los elementos de control, en particular en la región 5' no codificadora del ARNm (o el ADN (genómico) diana) ejerciendo una función reguladora. La secuencia diana de un ARN antisentido en el ARNm diana (o el ADN (genómico) diana) también se puede construir de modo que el ARN antisentido se une al ARNm (o el ADN (genómico) diana) cubriendo con su secuencia una región que es parcialmente complementaria a la secuencia (codificadora) no traducida y a la secuencia (codificadora) traducida del ARNm diana (o el ADN (genómico) diana). En particular, el ARN antisentido puede ser complementario a la secuencia de ARNm diana (o el ADN (genómico) diana) mediante al menos un nucleótido en dirección 5' desde el triplete de inicio de la región codificadora del ARNm diana. Preferentemente, el ARN antisentido tal como se utiliza aquí tiene una longitud entre aproximadamente 5 y aproximadamente 5.000, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5.000, y de forma especialmente preferente entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 5.000, o, alternativamente, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 1.000, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 500, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 250, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 nucleótidos, o alternativamente y de forma incluso más preferente una longitud entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80, o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 nucleótidos.

En otro ejemplo particular, las moléculas efectoras adecuadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar adicionalmente entre un medicamento citotóxico o antitumoral adecuado como medicamento quimioterapéutico. En general, los medicamentos quimioterapéuticos adecuados para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden dividir en tres categorías principales, según su mecanismo de acción. Pueden (a) detener la síntesis de unidades estructurales de moléculas preADN: estos agentes actúan en una serie de modos diferentes. Las unidades estructurales de ADN son ácido fólico, bases heterocíclicas y nucleótidos, que se producen de forma natural dentro de las células. Todos estos agentes actúan bloqueando algún paso en la formación de nucleótidos o desoxirribonucleótidos (necesarios para producir ADN). Cuando se bloquean estos pasos, los nucleótidos, que son las unidades estructurales del ADN y el ARN, no se pueden sintetizar. Por tanto, las células no se pueden replicar porque no pueden producir ADN sin los nucleótidos. Ejemplos de medicamentos de esta clase incluyen metotrexato (Abitrexate®), fluorouracilo (Adrucil®), hidroxiaurea (Hydrea®) y mercaptopurina (Purinethol®), tioguanina, tocoferol o, más generalmente, también cualquier análogo de nucleótido, por ejemplo análogos de 2'-desoxicitidina. Alternativamente, los medicamentos quimioterapéuticos pueden (b) dañar directamente el ADN en el núcleo de la célula. Estos agentes dañan químicamente el ADN y el ARN. Alteran la replicación del ADN y bien detienen totalmente la replicación, bien provocan la producción de ADN o ARN no codificantes (es decir, el nuevo ADN o ARN no codifica nada útil). Ejemplos de medicamentos de esta clase incluyen cisplatino (Platinol®) y antibióticos - daunorrubicina (Cerubidine®), doxorubicina (Adriamycin®) pertenecientes a la clase de agentes antitumorales de antraciclina (cuyos miembros pueden ser utilizados como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención) y etopósido (VePesid®) o cualquier intercalador. Por último, los medicamentos quimioterapéuticos pueden (c) efectuar la síntesis o disgregación de los husos mitóticos: los husos mitóticos sirven como vías moleculares con "polos norte y sur" en la célula cuando una célula comienza a dividirse en dos nuevas células. Estos husos son muy importantes porque ayudan a dividir el ADN recién copiado de modo que una copia va a cada una de las dos nuevas células durante la división celular. Estos medicamentos alteran la formación de dichos husos y con ello interrumpen la división celular. Ejemplos de medicamentos de esta clase de alteradores mitóticos incluyen: vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y paclitaxel (Taxol®). El componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede actuar de acuerdo con uno de los modos de acción arriba descritos. Dicho de otro modo, cada una de las clases de medicamentos antitumorales, es decir, agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos antitumorales y hormonas esteroideas, puede ser utilizada como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Para describir estas clases de medicamento con mayor detalle se debe recalcar que cada uno de los medicamentos anticáncer también se puede categorizar de acuerdo con su efecto en el ciclo celular y la química celular tal como se da a conocer más arriba. Los agentes alquilantes matan células atacando directamente al ADN. Los agentes alquilantes se pueden utilizar en el tratamiento de leucemias crónicas, la enfermedad de Hodgkin, linfomas y determinados carcinomas de pulmón, mama, próstata y ovario. La ciclofosfamida es un ejemplo de agente alquilante comúnmente utilizado. Las nitrosoureas actúan de modo similar a los agentes alquilantes y también inhiben cambios necesarios para la reparación del ADN. Estos agentes atraviesan la barrera hematoencefálica y con ello se utilizan para tratar tumores cerebrales, linfomas, mieloma múltiple y melanoma maligno. La carmustina y la lomustina son los principales medicamentos de esta categoría. Los antimetabolitos son los medicamentos que bloquean el crecimiento celular interfiriendo en determinadas actividades, normalmente la síntesis de ADN. Una vez ingeridos en la célula, detienen el desarrollo normal y

la reproducción. Todos los medicamentos de esta categoría afectan a la célula durante la fase "S" del ciclo celular. Los antimetabolitos se pueden utilizar en el tratamiento de leucemias agudas y crónicas, coriocarcinoma y algunos tumores del tracto gastrointestinal, mama y ovario. La 6-mercaptopurina y el 5-fluorouracilo (5FU) son ejemplos de antimetabolitos comúnmente utilizados. Los antibióticos antitumorales constituyen un grupo diverso de compuestos. En general, actúan uniéndose con ADN e impidiendo la síntesis de ARN. Estos agentes se utilizan mucho en el tratamiento de diversos cánceres. Los medicamentos de este grupo que se utilizan más comúnmente son la doxorubicina (adriamicina), la mitomicina-C y la bleomicina. Los alcaloides (de la vinca) vegetales son agentes antitumorales derivados de plantas. Estos medicamentos actúan específicamente bloqueando la división celular durante la mitosis. Se utilizan comúnmente en el tratamiento de la leucemia linfoblástica, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, neuroblastomas, tumor de Wilms y cánceres de pulmón, mama y testículo. La vincristina y la vinblastina son agentes de este grupo que se utilizan comúnmente. Las hormonas esteroideas son útiles para el tratamiento de ciertos tipos de tumores. Esta clase incluye adrenocorticosteroides, estrógenos, antiestrógenos, progesteronas y andrógenos. Aunque su mecanismo de acción específico no está claro, las hormonas esteroideas modifican el crecimiento de determinados cánceres dependientes de hormonas. El tamoxifeno es un ejemplo utilizado para el cáncer de mama dependiente de estrógenos. Todas las especies de tumor arriba mencionadas pueden ser tratadas mediante las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden como componente (B) cualquiera de los agentes antitumorales arriba indicados.

Un grupo de medicamentos citotóxicos o antitumorales que pueden ser utilizados como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se selecciona preferentemente entre medicamentos alquilantes, antimetabolitos, citostáticos o medicamentos relacionados con tratamientos hormonales. En este contexto es preferible seleccionar como medicamentos citotóxicos o antitumorales compuestos metálicos, en particular de (derivado de) platino y clases de taxol. En particular, la fracción de medicamento se selecciona entre el grupo de medicamentos que consiste, por ejemplo, en cisplatino, transplatino, satraplatino, oxaliplatino, carboplatino, nedaplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, azatioprina, fluorouracilo, (6)-mercaptopurina, metrexato, nandrolona, aminoglutemida, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, procarbazona, docetaxel, paclitaxel, irinotecano, epipodofilotoxina, podofilotoxina, vincristina, vinblastina, docetaxel, daunomicina, daunorubicina, doxorubicina, mitoxantrona, topotecán, bleomicina, gemcitabina, fludarabina, navelbina y 5-FUDR. La clase de medicamentos anticáncer que contienen metales, por ejemplo la clase de compuestos de platino, es particularmente preferente.

Otros medicamentos citotóxicos o antitumorales que pueden emplearse como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención son (identificados por su nombre genérico): alitretinoína, altretamina, azatioprina, bicalutamida, busulfán, capecitabina, ciclofosfamida, exemestano, letrozol, finasterida, acetato de megestrol, triptorelina, temozolomida, mifepristona, tretinoína, oral, tamoxifeno, teniposido, imatinib (Gleevec®), gefitinib (IRESSA®), sulfato de peplomicina o la clase de las canfotecinas.

Otro grupo de medicamentos citotóxicos o antitumorales que pueden utilizarse como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención son compuestos de indolocarbazol, por ejemplo estaurosporina (y sus análogos) y rebecamicina. Se ha de señalar que algunos compuestos pertenecientes a la clase de las anilinoquinazolininas (por ejemplo el gefitinib) también son particularmente preferentes como componente (B).

Un grupo más de medicamentos citotóxicos o antitumorales que pueden emplearse como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se puede seleccionar adicionalmente entre inhibidores de topoisomerasas, como irinotecano, o quinasas mitóticas o DHFR.

Adicionalmente, los medicamentos citotóxicos o antitumorales que pueden utilizarse como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar entre factores que inhiben o estimulan la proliferación celular (PDGF), vías intracelulares, por ejemplos la vía de señales RAS/RAF, como un miembro de la vía de señales RAF/MEK/ERK (por ejemplo RAF-1) o la vía de proteína quinasa activada por mitógenos, la familia de CMGC quinasas (que contienen CDK (quinasas dependientes de ciclina), MAPK, GSK3, CLK), quinasas Ser/Thr que pertenecen a la familia de las ABC quinasas que incluye familias de PLA, PKG, PKC quinasas, tirosina quinasas de receptor implicadas por ejemplo en la neovascularización y la progresión tumoral, incluyendo el receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)-2, VEGFR-3, el receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, Flt-3, el sistema de endotelina (ET), que incluye ET-1, ET-2, ET-3, y el receptor de ET_A (ET_AR) y ET_BR, y c-KIT, que se toman como diana por ejemplo inhibiendo su función, y miembros de la familia de las IGF, como IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGF2R, etc.

Otro grupo de medicamentos citotóxicos o antitumorales que pueden emplearse como moléculas efectoras para el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se puede seleccionar entre inhibidores dirigidos a la proliferación tumoral y la angiogénesis tumoral. En este contexto son particularmente preferentes los inhibidores de quinasa antitumorales de moléculas pequeñas dirigidos a dianas sobre células malignas y/o células vasculares que tienen actividad antiangiogénica. Los inhibidores de quinasa tales como los dirigidos a EGFR, Her2/neu, BCR-ABL, c-KIT, PKC, Raf y PI3 son antiangiogénicos en virtud de la secreción bloqueante de factores angiogénicos por células malignas afectadas. Los inhibidores de quinasa tales como los dirigidos a VEGFR2, VEGFR1, PDGFR, PKC, Raf y PI3 son antiangiogénicos por sus efectos en células vasculares. Los ejemplos de inhibidores sintéticos de quinazas dependientes de ciclina (CDKI) incluyen olomoucina, flavopiridol, butirolactona y sus derivados y por lo tanto limitan la proliferación celular. Por otro lado, los compuestos antitumorales adecuados como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar entre activadores de programas apoptóticos en células cancerosas (por ejemplo la estaurosporina) o por disminución de proteínas antiapoptóticas, por ejemplo Bcl-2.

Todos los compuestos arriba mencionados tienen en común que deben atravesar la membrana celular para actuar como medicamentos anticáncer. Mediante el acoplamiento de compuestos pertenecientes a cada una de estas clases (compuestos que dañan directamente el ADN en el núcleo de la célula, que efectúan la síntesis o disgregación de los husos mitóticos o que detienen la síntesis de unidades estructurales de moléculas preADN) como componente (B) con el componente (A) para formar la molécula conjugada transportador-carga de la invención, se mejora la entrada de los compuestos anticáncer en la célula y/o se mejora la solubilidad de éstos, aumentando así la eficacia de estos compuestos terapéuticos. A su vez, el aumento de la absorción celular y, preferentemente, la mayor solubilidad de estos compuestos en el entorno acuoso (por ejemplo el citosol) permiten reducir la dosificación del compuesto terapéutico anticáncer.

Adicionalmente, el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención también puede comprender pequeños compuestos orgánicos, como inhibidores de proteasas que inhiben proteasas, en particular proteasas que intervienen en el ciclo de infección de agentes infecciosos, por ejemplo proteasas virales, bacterianas o protozoológicas. En una realización preferente, estos inhibidores de proteasas (compuestos orgánicos o moléculas de medicamento) como parte de la molécula conjugada de la invención pueden servir para tratar infecciones virales, bacterianas o protozoológicas, por ejemplo la malaria. En particular, algunas infecciones virales se pueden tratar con inhibidores de proteasas, por ejemplo enfermedades retrovirales. El uso de moléculas conjugadas que incluyen inhibidores de proteasas es sumamente preferente para el tratamiento de infecciones por VIH. Los inhibidores de proteasas que se deben utilizar para acoplarse a la secuencia transportadora tal como se da a conocer aquí se pueden seleccionar entre un grupo que incluye 640385, sulfato de abacavir, AG1776, amprenavir (141W94 o VX-478), atazanavir (BMS-232632), inhibidor de proteasas catepsina S, D1927, D9120, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida (T-20), fosamprenavir (GW-433908 o VX-175), GS 9005, GW640385 (VX-385), inhibidor de proteasas del VHC, indinavir (MK-639), L-756, 423, levoprin-ZG, lopinavir (ABT-378), lopinavir/ritonavir (LPV ABT-378/r), MK-944A, mozenavir (DMP450), nelfinavir (AG-1343), nevirapina, P-1946, PL-100, prinomastat, ritonavir (ABT-538), RO033-4649, TMC114, saquinavir (Ro-31-8959), fumarato de disoproxil de tenofovir, tipranavir (PNU-140690), TLK 19781, TMC-114, Vertex 385, VX-950.

Por último, moléculas efectoras adecuadas pero no reivindicadas como componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden seleccionar como un componente separado de un marcador tal como se define más arriba en relación con la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Esta molécula conjugada transportador-carga es particularmente adecuada para ensayos *in vitro* o *in vivo*. En este contexto, los marcadores pueden comprender marcadores radiactivos, es decir, fosforilación radiactiva o un marcador radiactivo con azufre, hidrógeno, carbono, nitrógeno, etc.; tintes de color (por ejemplo digoxigenina, etc.); grupos fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, rodamina, proteínas de fluorocromo tal como se definen más abajo, etc.); grupos quimioluminiscentes; o una combinación de estos marcadores. Preferentemente, las proteínas de fluorocromo comprenden cualquier proteína de fluorocromo que pueda ser activada para emitir una señal fluorescente. De forma especialmente preferente, la proteína de fluorocromo se selecciona entre cualquier proteína fluorescente, por ejemplo de un grupo que comprende Proteína Verde Fluorescente (GFP), derivados de la Proteína Verde Fluorescente (GFP), por ejemplo EGFP, AcGFP, TurboGFP, Esmeralda, Verde Azami, la GFP fotoactivable (PA-GFP), o Proteína Azul Fluorescente (BFP), incluyendo EBFP, Zafiro, T-Zafiro, o Proteínas Cian Fluorescentes (CFP), incluyendo la proteína cian fluorescente intensificada (ECFP), mCFP, Cerulan, CyPet, o Proteínas Amarillas Fluorescentes, incluyendo Topacio, Venus, mCitrina, Ypet, PhiYFP, mBanana, la proteína verde fluorescente desplazada al amarillo (GFP Amarillo), la proteína amarilla fluorescente intensificada (EYFP), o Proteínas Naranja y Rojas Fluorescentes (RFP), incluyendo Naranja Kusibara, mNaranja, dTomato-Tandem, DsRed-Monomer, mMandarina, mFresa, proteína roja fluorescente monomérica (mRFP1) (también denominada aquí mRFP), mCereza, mFrambuesa, HcRed-Tandem, mCiruela, así como resaltadores ópticos seleccionados entre PA-GFP, CoralHue Dronpa (G), PS-CFP (C), PS-CFP (G), mEosFP (G), mEosFP (G), u otras proteínas

fluorescentes monoméricas tales como la proteína fluorescente kindling (KFP1), aequorina, las proteínas autofluorescentes (AFP), o las proteínas fluorescentes JRed, TurboGFP, PhiYFP y PhiYFP-m, tHc-Red (HcRed-Tandem), PS-CFP2 y KFP-Red (disponible en EVROGEN, véase también www.evrogen.com), u otras proteínas fluorescentes adecuadas.

- 5 La molécula conjugada transportador-carga de la invención que comprende los componentes (A) y (B) puede incluir además un componente adicional opcional (C), (D) y/o (E), etc., preferentemente diferente del componente (B). Esta o estas porciones adicionales opcionales pueden otorgar funciones adicionales a la proteína de fusión de la invención y se pueden seleccionar independientemente de otros componentes (B), (C), (D) y/o (E).
- 10 Por ejemplo, el o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. de la molécula conjugada transportador-carga de la invención pueden ser cualquiera de las moléculas efectoras tal como se describen más arriba en relación con el componente (B). Preferentemente, el o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. de la molécula conjugada transportador-carga de la invención no son idénticos al componente (B) específicamente seleccionado de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, es decir, el o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. preferentemente se pueden seleccionar, independientemente entre sí, entre diferentes moléculas efectoras o sus fragmentos o variantes tal como se describen más arriba. El o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. de la molécula conjugada transportador-carga de la invención pueden ser además aminoácidos, oligopéptidos o polipéptidos o un compuesto organo-químico (pequeño) y se puede unir a la molécula conjugada transportador-carga de la invención en una posición adecuada, por ejemplo el extremo N, el extremo C de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, o se puede acoplar internamente con aminoácidos, por ejemplo cadenas laterales de aminoácidos, o con ácidos nucleicos o cualquier posición adecuada de un componente (B) (o (A)). El o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. de la molécula conjugada transportador-carga de la invención también pueden ser una porción (por ejemplo HA, VHS-Tag, His6-Tag, FLAG-Tag), que puede hacer que la molécula conjugada transportador-carga de la invención sea susceptible de purificación y/o aislamiento. Si así se desea, el componente necesario para la purificación se puede retirar de los demás componentes de la molécula conjugada transportador-carga de la invención (por ejemplo por disociación proteolítica u otros métodos conocidos en la técnica) al final del proceso de producción.
- 20 Además, el o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. de la molécula transportador-carga de la invención pueden ser una secuencia señal o de localización, que dirige eficientemente la molécula conjugada transportador-carga de la invención a un emplazamiento diana intracelular particular, preferentemente sin perder las propiedades de permeabilidad celular aumentada de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Normalmente, una secuencia señal o de localización de este tipo dirige la molécula conjugada transportador-carga de la invención a compartimentos celulares específicos, por ejemplo el retículo endoplasmático, mitocondrias, el aparato de Golgi, vesículas lisosomales, etc. Ejemplos de secuencias señal o de localización incluyen, de forma no exclusiva, secuencias de localización para el retículo endoplasmático, como KDEL (SEQ ID N°: 238), DEL (SEQ ID N°: 239), DEEL (SEQ ID N°: 240), QEDL (SEQ ID N°: 241), RDEL (SEQ ID N°: 242), secuencias para la localización en el interior del núcleo, como PKKKRKV (SEQ ID N°: 243), PQKKIKS (SEQ ID N°: 244), QPKKP (SEQ ID N°: 245), RKKR (SEQ ID N°: 246), secuencias de localización para la región nuclear, como RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID N°: 247), RQARRNRRRWRERQR (SEQ ID N°: 248), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID N°: 249), secuencias para la localización en el interior del compartimento endosomal, como MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID N°: 250), etc.
- 30 De modo similar, el o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), etc. de la molécula conjugada transportador-carga de la invención pueden ser una secuencia señal o de localización que dirige eficientemente la molécula conjugada transportador-carga de la invención a un tipo de célula particular, preferentemente sin perder las propiedades de permeabilidad celular aumentada de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.
- 35 La molécula conjugada transportador-carga de la invención puede comprender además al menos una modificación, preferentemente en sus extremos, en el extremo C o en el extremo N, o en ambos. El extremo C se puede modificar preferentemente mediante una modificación de amida, mientras que el extremo N se puede modificar mediante cualquier grupo de protección de NH₂ adecuado, por ejemplo acilación, o cualquier otra modificación tal como ya se ha indicado más arriba en relación con los L-aminoácidos. Estas modificaciones también incluyen la introducción de marcadores tal como se definen más arriba para las moléculas transportadores de la invención de acuerdo con la fórmula general (I) arriba mostrada.
- 55

Por último, los componentes (B), (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se describe más arriba, así como engarces que se pueden utilizar opcionalmente para

- interconectar estos componentes, pueden comprender o consistir en secuencias de proteínas o péptidos. Estas secuencias de proteínas o péptidos pueden estar compuestas por L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos, preferentemente tal como se describe más arriba en relación al constructo transportador de la invención definido anteriormente de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) mostradas. Estos D- y/o L-aminoácidos pueden estar dispuestos en los componentes (B), (C), (D) y/o (E) por bloques, no por bloques o de un modo alternado. Alternativamente, para estos componentes se puede repetir un patrón tal como se describe más arriba en relación con el constructo transportador de la invención definido anteriormente de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) mostradas.
- 5 Dicho de otro modo, se puede aplicar la fórmula genérica (I) (SEQ ID N°: 1) $D_1 L L L_x D_m (L L L_y D_n)$ tal como se define más arriba, donde el número de repeticiones definido por "a" no está limitado a un intervalo de 0 - 3, sino que se puede aplicar a la molécula completa, es decir, "a" será 1 a 500, 1 a 250, 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 5 o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc., y está determinada preferentemente por la longitud de las secuencias proteicas o peptídicas a abarcar.
- 10 Normalmente, los componentes (A), (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención y los componentes opcionales adicionales (C), (D) y/o (E), etc., si están presentes, se acoplan entre por enlaces covalentes o por unión electrostática (por ejemplo polilisina), preferiblemente por enlaces covalentes. En este contexto, el concepto "enlace covalente" se refiere a un enlace químico estable entre dos átomos producido por la compartición de uno más pares de electrones. Preferentemente, todos los componentes (A) y (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención y los componentes opcionales adicionales (C), (D) y/o (E), etc., si están presentes, se pueden acoplar formando una molécula lineal o una molécula no lineal (ramificada), preferentemente una molécula lineal. En una molécula lineal, todos los componentes (A) y (B) arriba indicados y los componentes opcionales adicionales (C), (D) y/o (E), etc., si están presentes, están unidos entre sí a través de sus extremos terminales de forma lineal, que no conduce a una molécula conjugada transportador-carga ramificada. En una molécula no lineal (ramificada), todos los componentes (A) y (B) arriba indicados y los componentes opcionales adicionales (C), (D) y/o (E), etc., si están presentes, están unidos entre sí a través de sus extremos terminales de forma que conduce a una molécula conjugada transportador-carga ramificada, por ejemplo con una forma en configuración Y, etc.
- 15 Dado que el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención es por definición una secuencia peptídica consistente en D- y L-aminoácidos, la unión (covalente) de otros componentes (B) y componentes opcionales (C), (D) y/o (E), si están presentes, evidentemente puede depender del tipo y la naturaleza de los componentes a unir, es decir, de si los componentes individuales son proteínas o péptidos, ácidos nucleicos, compuestos orgánicos (pequeños), etc.
- 30 El orden en el que el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención y los componentes opcionales adicionales (C), (D) y/o (E), si están presentes, se unen al componente (A) y entre sí para formar una molécula preferentemente lineal puede ser normalmente cualquier orden. Por consiguiente, cualquiera de los componentes (A), (B) y, si están presentes, (C), (D) y/o (E), etc. se pueden unir entre sí. Sin embargo, el componente (A) se une preferentemente en los extremos terminales de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Si cualquiera de los componentes (B) y, si están presentes, (C), (D) y/o (E) es una proteína o una secuencia peptídica, el componente (A) está contenido preferentemente en el extremo C-terminal de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, por ejemplo en el extremo C-terminal del componente (B) tal como se define más arriba o, si están presentes, de los componentes (C), (D) y/o (E), cuando está presente en forma de un péptido o una proteína. Esta posición del componente (A) en la molécula conjugada transportador-carga de la invención evita que la secuencia de péptidos o proteínas de carga de los componentes (B), (C), (D) y/o (E) se degrade antes de su transporte al sitio diana deseado, por ejemplo la célula, el núcleo, etc. por una peptidasa, en particular una carboxi peptidasa, como la peptidasa N carboxiterminal. Alternativamente, si los sistemas celulares utilizados incluyen peptidasas aminotermiales, el componente (A) puede estar localizado en el extremo aminoterminal de la molécula conjugada transportador-carga de la invención.
- 35 Si el componente adicional (B) y/o, si están presentes, cualquiera de los componentes opcionales (C), (D) y/o (E) es una secuencia de péptidos o proteínas, la unión entre estos componentes de proteínas o péptidos de la molécula conjugada transportador-carga de la invención normalmente es un enlace peptídico. Dicho enlace peptídico se puede formar utilizando una síntesis química que incluye los dos componentes (un extremo N-terminal de un componente y el extremo C-terminal del otro componente) a unir, o se puede formar directamente a través de una síntesis de proteínas de toda la secuencia de péptidos de los dos componentes, sintetizándose ambos componentes (proteína o péptido) preferentemente en un paso. Estos métodos de síntesis de proteínas incluyen, por ejemplo, de forma no exclusiva, métodos de síntesis de péptidos en fase líquida o métodos de síntesis de péptidos sólidos, por ejemplo métodos de síntesis de péptidos sólidos de acuerdo con Merrifield, síntesis de péptidos en fase sólida *t*-Boc, síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc,
- 40 45 50 55

síntesis de péptidos en fase sólida basados en BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio), etc.

Además, el componente (A) y el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se pueden acoplar mediante un engarce o directamente (sin engarce), por ejemplo con un puente amida, si los componentes a unir tienen grupos amino o carboxi reactivos. Alternativamente son preferentes los engarces éter.

Si están presentes, los componentes (C), (D) y/o (E), etc., tal como se mencionan más arriba, se pueden acoplar de forma análoga con el componente (A) y/o el componente (B), u opcionalmente entre sí para unirlos como una sola fracción al componente (A) o al componente (B). También es posible utilizar secuencias de engarce para fundir los componentes de la molécula conjugada transportador-carga de la invención con al menos otro componente (véase más abajo). El modo de acoplamiento de otro u otros componentes con el componente (A) o el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención dependerá de su carácter químico. Si los componentes adicionales (C), (D), (E), etc. pertenecen a la clase de las secuencias peptídicas, preferentemente se unirán a la molécula conjugada transportador-carga de la invención por cualquiera de los extremos del componente (A) o, alternativamente, se unirán a través de cadenas laterales de L- o D-aminoácidos del componente (A), por ejemplo mediante un puente disulfuro. Otros componentes de otra naturaleza química se pueden unir similarmente al componente (A) (grupos terminales o grupos de cadena lateral químicamente activa) o al componente (B). La unión a través de una cadena lateral se basará preferentemente en grupos amino, tiol o hidroxilo de cadena lateral, por ejemplo con un enlace amida, éster o éter. Se ha de señalar que, de acuerdo con la invención, todos los aminoácidos (del componente (A) y, si están formados por aminoácidos, los componentes (C), (D), (E), etc.) preferentemente son aminoácidos D-enantioméricos, que reflejan su análogo final natural al estar unidos en orden retroinverso. No obstante, los componentes (C), (D), (E), etc., si están compuestos por aminoácidos, también pueden estar compuestos por L-aminoácidos (en su orden de secuencia natural) o estar formados por una combinación de D- y L-aminoácidos.

Si se utilizan secuencias de engarce peptídico para fusionar los componentes (A) y (B) o para fusionar otros componentes, por ejemplo el componente (C), con los componentes (A) y/o (B), las secuencias de engarce forman preferentemente una secuencia flexible de 2 a 10 residuos, de forma especialmente preferente de 1 a 5 residuos. En una realización preferente, la secuencia de engarce contiene al menos un 20%, de forma especialmente preferente al menos un 40% y de forma incluso más preferente al menos un 50% de residuos Gly o β-alanina, por ejemplo GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID N°: 255), GlyGlyGlyGly (SEQ ID N°: 256), GlyGlyGly, CysGlyGly o GlyGlyCys, etc. Las secuencias de engarce adecuadas pueden ser seleccionadas y preparadas fácilmente por un especialista en la técnica. Pueden estar compuestas por D- y/o L-aminoácidos.

Las secuencias de engarce peptídico también se pueden introducir entre un componente (A) y un componente (B), y/o otros componentes (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, añadiéndose una metionina aminoterminal al componente (A) y/o antes de una secuencia de proteínas o péptidos al componente (B), (C), (D) y/o (E).

Preferentemente, el componente (A) y el componente (B) están unidos por acoplamiento químico de cualquier modo adecuado conocido en la técnica, tal como métodos de reticulación. No obstante, se ha de señalar que muchos métodos de reticulación química conocidos no son específicos, es decir, no dirigen el punto de acoplamiento a ningún sitio particular de la fracción transportadora o la fracción de carga. Por tanto, el uso de agentes de reticulación no específicos puede atacar sitios funcionales o bloquear estéricamente sitios activos, haciendo que los componentes fusionados de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se vuelvan biológicamente inactivos. Se deja al conocimiento del trabajador cualificado el bloqueo de grupos potencialmente reactivos mediante el uso de grupos protectores apropiados. Alternativamente es posible emplear las técnicas potentes y versátiles de ligamiento de oxima e hidrazona, que son entidades quimioselectivas que pueden ser aplicadas a la reticulación del componente (A) con el componente (B). Por ejemplo, Rose y col. (1994), JACS 116, 30, describen esta tecnología de enlace. Los componentes adicionales (C), (D), (E), etc. tal como se mencionan más arriba, si están presentes, se pueden acoplar químicamente de forma análoga entre sí o con el componente (A) y/o (B).

La especificidad de acoplamiento se puede aumentar mediante un acoplamiento químico directo con un grupo funcional que se halla una sola vez o unas pocas veces en el componente (A), reticulándose dicho grupo funcional con la molécula orgánica del componente (B). Por ejemplo, el grupo cisteína tiol se puede utilizar si el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención sólo presenta un residuo cisteína. Además, por ejemplo, si un componente (A) de la molécula conjugada no contiene ningún residuo lisina, un reactivo de reticulación específico para aminas primarias será selectivo para el extremo amino del componente (A). Alternativamente, la reticulación también se puede llevar a cabo a través de la cadena lateral de un residuo de ácido glutámico situado en el extremo N del péptido, de modo que se puede

generar un enlace amida por su cadena lateral. Por ello puede resultar ventajoso unir un residuo de ácido glutámico al extremo N del componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. No obstante, si se ha de introducir un residuo cisteína en el componente (A), es preferible una introducción en su extremo N o C. Existen métodos convencionales disponibles para estas alteraciones de secuencias de aminoácidos basados en modificaciones del componente (A), bien añadiendo uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo un residuo cisteína, entre otros, a la secuencia de translocación, bien sustituyendo al menos un residuo de la o las secuencias de translocación incluidas en el componente (A). Si se utiliza una cadena lateral de cisteína con fines de acoplamiento, el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tiene preferiblemente un residuo cisteína. Preferentemente, un eventual segundo residuo cisteína se debería evitar y finalmente se puede sustituir si está presente en el componente (A) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Cuando un residuo cisteína se sustituye en la secuencia de translocación original a utilizar o como parte del componente (A), normalmente es deseable minimizar los cambios resultantes en el pliegue peptídico del componente (A). Los cambios en el pliegue del componente (A) se minimizan cuando la sustitución es química y estéricamente similar a la cisteína. Por tanto, la serina es preferente como sustitutivo de la cisteína.

El acoplamiento de los dos constituyentes de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se puede llevar a cabo mediante un agente de acoplamiento o conjugación, incluyendo reactivos de acoplamiento de síntesis peptídica estándar, como HOBt, HBTU, DICl, TBTU. Existen diversos reactivos de reticulación intermolecular que pueden emplearse, véase, por ejemplo, Means and Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Entre estos reactivos se encuentran, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida; N,N'-etilenbis(yodoacetamida) u otros reactivos de este tipo que tienen de 6 a 11 puentes de carbono metileno; y 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzoceno. Otros reactivos de reticulación útiles para este fin incluyen: p,p'-difluor-m,m'-dinitrodifenilsulfona; adipimidato de dimetilo; cloruro de fenol-1,4-disulfonilo; diisocianato o diisotiocianato de hexametileno, o azofenil-p-diisocianato; glutaraldehído y disdiazobencidina. Los reactivos de reticulación pueden ser homobifuncionales, es decir, tener dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferente es el bismaleimidohexano (BMH). El BMH contiene dos grupos funcionales maleimida que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo bajo condiciones suaves (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están conectados por una cadena hidrocarburo. Por tanto, el BMH es útil para la reticulación irreversible de proteínas (o polipéptidos) que contienen residuos cisteína. Los reactivos de reticulación también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo amino y un grupo reactivo con tiol, que reticularán dos proteínas que tengan aminas y tioles libres, respectivamente. Ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales son: succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), un análogo de MBS de cadena prolongada. El grupo succinimidilo de estos reticulantes reaccionan con una amina primaria y la maleimida reactiva con tiol forma un enlace covalente con el tiol de un residuo cisteína. Dado que los reactivos de reticulación con frecuencia tienen baja solubilidad en agua, se puede añadir una fracción hidrófila, como un grupo sulfonato, al reactivo de reticulación para mejorar su solubilidad en agua. El sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados para solubilidad en agua. Muchos reactivos de reticulación producen un conjugado que esencialmente no es disociable bajo condiciones celulares. Por tanto, algunos reactivos de reticulación contienen un enlace covalente, como disulfuro, que se puede disociar bajo condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, el ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son reticulantes disociables bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación disociable permite separar los componentes (B), (C), (D) y/o (E) de la fracción de carga del componente (A) del constructo transportador después de la introducción en la célula diana. Con este fin, un enlace disulfuro directo también puede ser útil. La reticulación química también puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre fracciones conjugadas y así ayudan a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede ser una fracción de proteína (o polipéptido) que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo prolina. Alternativamente, un brazo espaciador puede formar parte del reactivo de reticulación, como en "long-chain SPDP" (Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., n° cat. 21651 H). Numerosos reactivos de reticulación, incluyendo los arriba descritos, son comerciales. Las instrucciones detalladas para su uso se pueden obtener fácilmente de los proveedores comerciales. Una referencia general sobre la reticulación de proteínas y la preparación de conjugados es: Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991).

De acuerdo con otra realización preferente, una molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba puede comprender o consistir en al menos una variante y/o fragmento de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención arriba definidas. Preferentemente, las variantes y/o fragmentos de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención arriba definidas conservan la actividad biológica de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención tal como se da a conocer más arriba. La funcionalidad de estos fragmentos o variantes se puede analizar mediante diversas pruebas,

por ejemplo eficacia de transfección, expresión correcta de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de carga, o mediante métodos biofísicos, por ejemplo espectroscopía, modelización por ordenador, análisis estructural, etc., de modo similar al arriba descrito en relación con los constructo-transportadores de la invención tal como se definen más de fórmula genérica (I).

5 De forma incluso más preferente, las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención arriba definidas comprenden o consisten en al menos una variante (y/o fragmento), en particular si los componentes individuales son secuencias de proteínas o péptidos. En el contexto de la invención, estas variantes (y/o fragmentos) de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención arriba definidas pueden tener una identidad de secuencia con respecto a sus secuencias nativas, por ejemplo un fragmento o una variante
10 de la molécula conjugada transportador-carga de la invención arriba definida con respecto a su secuencia de molécula conjugada transportador-carga nativa, de al menos un 70%, 80% u 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% a lo largo de toda la longitud de la molécula conjugada transportador-carga nativa de la invención.

15 Un "fragmento" de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención arriba definidas, en particular si los componentes individuales son secuencias de proteínas o péptidos, se debe entender preferiblemente como una secuencia truncada de las mismas, es decir, una secuencia de aminoácidos de la molécula conjugada transportador-carga de la invención arriba definida, que está truncada en el extremo N, en el extremo C y/o dentro de la secuencia en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula conjugada transportador-carga nativa de la invención tal como se define más arriba.

20 Una "variante" de la molécula conjugada transportador-carga de la invención arriba definida comprende preferentemente una secuencia donde la secuencia de aminoácidos de la molécula conjugada transportador-carga de la invención se diferencia de la secuencia nativa de la molécula conjugada transportador-carga de la invención arriba definida en una o más mutaciones, como uno o más aminoácidos sustituidos (o en caso necesario insertados y/o eliminados por delección). Preferentemente, las variantes de las moléculas
25 conjugadas transportador-carga de la invención arriba definidas tienen la misma función biológica o actividad específica que las moléculas conjugadas transportador-carga nativas de longitud completa tal como se definen más arriba. Preferentemente, una variante puede comprender aproximadamente 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, preferiblemente 1 a 10 y de forma especialmente preferente 1 a 5, 4, 3, 2, o 1 alteraciones de aminoácidos dentro del significado arriba indicado. Estas alteraciones pueden comprender, entre otras,
30 modificaciones de aminoácidos tal como se definen más arriba, introducción de marcadores en aminoácidos tal como se definen más arriba, sustitución de un aminoácido por cualquiera de los aminoácidos (modificados o marcados) aquí mencionados, delecciones o inserciones de aminoácidos. Además, las variantes tal como se definen aquí preferentemente comprenden sustituciones de aminoácidos conservativas, preferiblemente tal como se ya han definido más arriba.

35 De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende preferentemente la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba y opcionalmente un soporte y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, o cualquier excipiente, tampón, estabilizador u otros materiales conocidos por los especialistas.

40 Como primer ingrediente, la composición farmacéutica de la invención comprende la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba, es decir una molécula conjugada transportador-carga de la invención que incluye como componente (A) el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas, y como componente (B) una molécula efectora seleccionada entre proteínas y péptidos terapéuticamente activos, inhibidores de la proteína quinasa,
45 en particular inhibidores de la proteína quinasa c-Jun quinasa amino terminal, antígenos, anticuerpos, factores apoptóticos, proteasas implicadas en estados patológicos, preferentemente inhibidores de proteasas peptídicas, dominios BH3, proteínas solo BH3, ácidos nucleicos que codifican estas proteínas ARNip, ARN antisentido, agentes citotóxicos y pequeños compuestos orgánicos. Opcionalmente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba también puede contener componentes
50 adicionales (C), (D) y/o (E), etc.

55 Como segundo ingrediente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender o no un soporte y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un soporte farmacéuticamente aceptable incluye normalmente la base líquida o no líquida de la composición farmacéutica de la invención. Si la composición farmacéutica de la invención se encuentra en forma líquida, el soporte consistirá normalmente en agua libre de pirógenos; solución salina isotónica o soluciones (acuosas) tamponadas, por ejemplo soluciones tamponadas fosfato, citrato, etc. En particular, para la inyección de la composición farmacéutica de la invención se puede utilizar agua o preferentemente un tampón, de forma especialmente preferente un tampón acuoso, que contiene una sal de sodio, preferentemente al menos 50

mM de una sal de sodio, una sal de calcio, preferentemente al menos 0,01 mM de una sal de calcio, y opcionalmente una sal de potasio, preferentemente al menos 3 mM de una sal de potasio. De acuerdo con una realización preferente, las sales de sodio, calcio y opcionalmente potasio se pueden encontrar en forma de sus haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos, etc. De forma no exclusiva, ejemplos de sales de sodio incluyen NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, ejemplos de las sales de potasio opcionales incluyen KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, y ejemplos de sales de calcio incluyen CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Además, el tampón puede contener aniones orgánicos de los cationes arriba mencionados. De acuerdo con una realización especialmente preferente, el tampón adecuado para inyecciones tal como se define más arriba puede contener sales seleccionadas entre cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), pudiendo estar presentes otros aniones además de los cloruros. El CaCl₂ también se puede sustituir por otra sal tal como KCl. Normalmente, las sales del tampón de inyección están presentes en una concentración de cloruro de sodio (NaCl) al menos 50 mM, cloruro de potasio (KCl) al menos 3 mM y cloruro de calcio (CaCl₂) al menos 0,01 mM. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con respecto al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido de sal mayor, idéntico o menor con respecto al medio de referencia específico, pudiendo utilizarse preferiblemente las concentraciones de las sales arriba mencionadas que no producen daños en las células debido a ósmosis u otros efectos de concentración. Medios de referencia son, por ejemplo, líquidos presentes en métodos "in vivo", como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que pueden emplearse como medios de referencia en métodos "in vitro", tales como tampones o líquidos comunes. Los especialistas conocen estos tampones o líquidos comunes. La solución de lactato de Ringer es particularmente preferente como base líquida.

No obstante, para la composición farmacéutica de la invención también se pueden utilizar uno o más materiales de carga, diluyentes o compuestos de encapsulación sólidos o líquidos compatibles que sean adecuados para la administración a un paciente a tratar. El término "compatible" tal como se utiliza aquí significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica de la invención se pueden mezclar con la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba de modo que no se produce ninguna interacción que pueda reducir sustancialmente la eficacia farmacéutica de la composición farmacéutica de la invención bajo las condiciones de uso normales. Evidentemente, los soportes, materiales de carga y diluyentes farmacéuticamente aceptables deben tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja para que sean adecuados para ser administrados a una persona a tratar. Ejemplos de compuestos que pueden emplearse como soportes, materiales de carga o constituyentes farmacéuticamente aceptables son azúcares, por ejemplo lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o almidón de patata; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; sebo; lubricantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, por ejemplo polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar vía oral, parenteral, por espray de inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. Tal como se utiliza aquí, el término "parenteral" incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardíaca, intraarterial y sublingual, o técnicas de infusión.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar por inyección parenteral, de forma especialmente preferente por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardíaca, intraarterial y sublingual, o técnicas de infusión. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden consistir en una suspensión acuosa u oleosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas utilizando agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, como disolvente o medio de suspensión se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como un medio disolvente o de suspensión. Con este fin se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono-o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico y sus derivados de glicérido son útiles en la preparación de inyectables, como aceites naturales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un dispersante o diluyente de alcohol de cadena larga, como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares utilizados comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. Para los fines

de formulación de la composición farmacéutica de la invención, también se pueden utilizar otros agentes tensioactivos comúnmente empleados, como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o intensificadores de la biodisponibilidad comúnmente utilizados en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables.

- 5 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el lugar de dolencia, el ingrediente activo estará preferentemente en forma de solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Las personas con un conocimiento técnico relevante pueden preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactato. También se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Independientemente de que se trate de un polipéptido, péptido o molécula de ácido nucleico, u otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención que deba ser administrado a un individuo, la administración se lleva a cabo preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea aplicable), siendo ésta suficiente para beneficiar al individuo.
- 10
- 15 La cantidad exacta administrada, y la velocidad y la evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad tratada.

- La composición farmacéutica de la invención tal como se define más arriba también se puede administrar vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, de forma no exclusiva, cápsulas, pastillas, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de las pastillas para uso oral, los soportes normalmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Normalmente también se añaden agentes lubricantes, como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo, es decir, la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba, se combina con agentes emulsionantes o de suspensión. Si así se desea, también es posible añadir determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.
- 20
- 25

- La composición farmacéutica de la invención también se puede administrar vía tópica, en especial cuando el objetivo de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante la aplicación tópica, incluyendo, por ejemplo, enfermedades de la piel o cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos se preparan fácilmente. Para aplicaciones tópicas, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una pomada adecuada que contiene la composición inmunoestimuladora de la invención, en particular sus componentes tal como se definen más arriba, suspendidos o disueltos en uno o más soportes. Los soportes para la administración tópica incluyen, de forma no exclusiva, aceite mineral, aceite de vaselina, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los soportes adecuados incluyen, de forma no exclusiva, aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencilico y agua.
- 30
- 35

- En este contexto, la prescripción de un tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc. cuando se utiliza la composición farmacéutica arriba descrita forma parte normalmente de la responsabilidad de los facultativos generales y otros doctores médicos, y normalmente tiene en cuenta la afección a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. En REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, edición 16, Osol, A. (ed), 1980, se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos arriba mencionados. Por consiguiente, la composición farmacéutica de la invención comprende normalmente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, en particular de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba. Tal como se utiliza aquí, una "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o afección tal como se define aquí. Sin embargo, al mismo tiempo, una "cantidad segura y efectiva" es suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios serios, es decir, para posibilitar una relación prudente entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites está normalmente dentro del alcance de un juicio médico sensato. Una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, en particular de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba variará además en relación con la enfermedad particular a tratar y también con la edad y el estado físico del paciente a tratar, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la relación de excreción, la combinación de medicamentos, la actividad de los componentes específicos (A), (B), (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba, la gravedad de la enfermedad, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concomitante, del soporte farmacéuticamente aceptable particular utilizado y de factores similares, dentro del
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

conocimiento y la experiencia del doctor. La composición farmacéutica de la invención puede emplearse para fines médicos humanos y también veterinarios, preferentemente para fines médicos humanos, como una composición farmacéutica en general o como una vacuna.

5 De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica de la invención se puede suministrar como una vacuna, por ejemplo si el componente (B) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención es una proteína terapéuticamente activa tal como un antígeno o fragmento antigénico (de péptido o proteína) o cualquier molécula tal como se describen más arriba adecuada para provocar una respuesta inmunitaria. Una vacuna de la invención de este tipo está compuesta normalmente como la composición farmacéutica de la invención y preferentemente apoya una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa del sistema inmunológico de un paciente a tratar, dependiendo de la naturaleza de los componentes (B), (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba. Por ejemplo, si cualquiera de estos componentes proporciona o codifica un antígeno o fragmento antigénico (de proteína o péptido), la vacuna normalmente producirá una respuesta inmunitaria adaptativa en el paciente a tratar. De modo similar, cualquiera de los otros componentes (B), (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba puede conducir a una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa.

20 La vacuna de la invención también puede comprender un soporte, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se definen más arriba para la composición farmacéutica de la invención. En el contexto específico de la vacuna de la invención, la selección de un soporte farmacéuticamente aceptable está determinada en principio por el modo de administración de la vacuna de la invención. La vacuna de la invención se puede administrar, por ejemplo, de forma sistémica o local. Las vías de administración sistémica incluyen en general, por ejemplo, vías transdérmicas, orales, parenterales, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales y/o vías de administración intranasales. Las vías para la administración local incluyen en general, por ejemplo, vías de administración tópica, pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o intramusculares, o inyecciones intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardíacas y sublinguales. De forma especialmente preferente, las vacunas se pueden administrar vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Por tanto, las vacunas de la invención se formulan preferentemente en forma líquida (o a veces en forma sólida). La cantidad adecuada de la vacuna de la invención a administrar se puede determinar mediante experimentos rutinarios con modelos animales. Estos modelos incluyen, sin que esto implique ninguna limitación, modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primates no humanos. Las formas de dosificación unitaria preferentes para la inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones se debería ajustar a un valor de aproximadamente 7,4. Los soportes adecuados para la inyección incluyen hidrogeles, dispositivos para la liberación controlada o retrasada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la aplicación tópica incluyen aquellos que son adecuados para su uso en lociones, cremas, geles y similares. Si la vacuna de la invención se debe administrar vía oral, las pastillas, cápsulas y similares son la forma de dosificación unitaria preferente. Los soportes farmacéuticamente aceptables para preparar formas de dosificación unitaria que pueden emplearse para la administración oral son bien conocidos en el estado anterior de la técnica. La selección de los mismos dependerá de consideraciones secundarias tales como sabor, coste y aptitud para almacenamiento, que no son críticas para los objetivos de la presente invención, y puede ser realizada sin dificultad por una persona con experiencia en la técnica.

45 La vacuna de la invención puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares para aumentar más su inmunogenicidad. De este modo se logra preferentemente una acción sinérgica de la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba y una sustancia auxiliar, que puede estar contenida opcionalmente en la vacuna de la invención tal como se describe más arriba. Dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, a este respecto se pueden tener en cuenta diversos mecanismos. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de células dendríticas (DC), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, como sustancia auxiliar se puede utilizar cualquier agente que influya en el sistema inmunológico a modo de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, como GM-CSF, que permiten aumentar y/o influir de forma dirigida en una respuesta inmunitaria producida por el adyuvante inmunoestimulador de acuerdo con la invención. Sustancias auxiliares particularmente preferentes son citoquinas, como monoquinas, linfocinas, interleucinas o quimiocinas, que promueven adicionalmente la respuesta inmunitaria innata, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, INF-alfa, INF-beta, INF-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, como hGH.

Otros aditivos que pueden ser incluidos en la vacuna de la invención son emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, soportes farmacéuticos; agentes formadores de pastillas; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.

5 La vacuna de la invención también puede contener adicionalmente cualquier otro compuesto conocido por ser inmunoestimulador debido a su afinidad de unión (como ligandos) con receptores de tipo Toll TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligandos) con receptores de tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

10 Otra clase de compuestos que pueden ser añadidos a una vacuna de la invención en este contexto pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN. Un CpG-ARN o CpG-ADN puede ser un CpG-ADN monocatenario (CpG-ADN mc), un CpG-ADN bicatenario (ADNbc), un CpG-ARN monocatenario (CpG-ARN mc) o un CpG-ARN bicatenario (CpG-ARN bc). El ácido nucleico CpG está preferentemente en forma de CpG-ARN, de forma especialmente preferente en forma de un CpG-ARN monocatenario (CpG-ARN mc). El ácido nucleico CpG contiene preferentemente al menos una o más secuencias de dinucleótidos de citosina/guanina (mitogénicos) (motivo(s) CpG). De acuerdo con una primera alternativa preferente, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG, no está metilado. Todas las demás citosinas o guaninas opcionalmente contenidas en estas secuencias pueden estar metiladas o no metiladas. No obstante, de acuerdo con otra alternativa preferente, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG también pueden estar presentes en forma metilada.

20 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba puede ser utilizada (para la preparación de una composición farmacéutica o una vacuna, preferentemente ambas tal como se definen aquí) para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades cancerosas o tumorales, incluyendo enfermedades causadas por apoptosis defectuosa, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades (infecciosas) virales, enfermedades estrechamente relacionadas con las señales de JNK, enfermedades o afecciones autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neuronales o neurodegenerativas, enfermedades hepáticas, enfermedades de la columna, enfermedades del útero, trastornos depresivos mayores, enfermedades digestivas inflamatorias crónicas o no crónicas y pérdidas de audición o enfermedades del oído interno. La molécula conjugada transportador-carga de la invención también se puede utilizar (para la preparación de una composición farmacéutica) para su uso en trasplantes de tejidos bien tratando los órganos/tejidos/células a trasplantar, bien tratando al receptor del órgano/tejido/células.

35 La profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de una enfermedad tal como se definen aquí incluyen normalmente la administración de una composición farmacéutica tal como se define más arriba. El término "profilaxis" se refiere normalmente a la prevención de una enfermedad tal como se define aquí en un paciente, preferentemente antes de la manifestación de la enfermedad en el paciente. El término "tratamiento" se refiere generalmente a cualquier tratamiento de una enfermedad tal como se define aquí en un paciente, en el que la enfermedad puede haber sido ya diagnosticada o ha de ser prevenida, es decir, antes, paralelamente o a continuación de la manifestación de la enfermedad en el paciente. El término "tratamiento" utilizado por ejemplo en el concepto "tratar una enfermedad" significa además preferentemente al menos la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico para provocar un efecto terapéutico. Esto no implica necesariamente una "curación", sino más bien que tiene preferentemente al menos algún efecto fisiológico mínimo en una enfermedad después de la administración a un organismo vivo que padece dicha enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento podría incluir la administración de un agente, conduciendo la presencia de dicho agente a un cambio en la fisiología de un animal receptor. Por último, el término "mejoría" incluye preferentemente cualquier modificación de una enfermedad tal como se define aquí, preferentemente una modificación positiva de la enfermedad tal como se define aquí. La modificación específica puede depender de la enfermedad a tratar.

50 De acuerdo con un método, una composición farmacéutica de la invención, una vacuna o una molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba pueden ser administradas directamente a un paciente utilizando las vías de administración descritas anteriormente para las composiciones farmacéuticas. Alternativamente, una composición farmacéutica, una vacuna o una molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba pueden ser administradas a un paciente utilizando un método *ex vivo*, por ejemplo introduciendo la composición farmacéutica, la vacuna o la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba en células, preferentemente células autólogas, es decir, células derivadas del paciente a tratar, y trasplantando estas células en el sitio del paciente a tratar, opcionalmente después de almacenar y/o cultivar estas células antes del tratamiento.

- De acuerdo con una realización preferente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención tal como se describen más arriba pueden emplearse para la (preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría, por ejemplo, de enfermedades cancerosas o tumorales, incluyendo enfermedades causadas por apoptosis defectuosa, preferentemente seleccionadas entre neuroma acústico, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, síndrome de Behcet, cáncer de vejiga, blastomas, cáncer de hueso, metástasis de cerebro, tumores cerebrales, cáncer de cerebro (glioblastomas), cáncer de mama (carcinoma de mama), linfoma de Burkitt, carcinoides, cáncer cervical, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de cuerpo uterino, craneofaringiomas, síndrome de CUP, carcinoma endometrial, cáncer de la vesícula biliar, tumores genitales, incluyendo cánceres del tracto genitourinario, glioblastoma, gliomas, tumores de cabeza/cuello, hepatomas, linfomas histocíticos, síndromes o linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, tumor de hipófisis, cáncer intestinal, incluyendo tumores del intestino delgado, y tumores gastrointestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, carcinomas de riñón, cáncer laríngeo o cáncer de laringe, leucemia, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), eritroleucemia, leucemia linfóide aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfóide crónica (CLL), tumor palpebral, cáncer de hígado, metástasis de hígado, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas y carcinomas de pulmón de células no pequeñas, y adenocarcinoma de pulmón, linfomas, cáncer linfático, melanomas malignos, carcinomas de mama (= cáncer de mama), meduloblastomas, melanomas, meningiomas, micosis fungoide, neuroma de enfermedades neoplásicas, cáncer esofágico, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), oligodendroglioma, cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma de ovario, carcinoma pancreático (= cáncer de páncreas), cáncer fálco, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumor de la pituitaria, plasmocitoma, cáncer de próstata (= tumores de próstata), carcinoma rectal, tumores rectales, cáncer renal, carcinomas renales, retinoblastoma, sarcomas, enfermedad de Schneeberger, cáncer de piel, por ejemplo cáncer cutáneo melanoma o no melanoma, incluyendo carcinomas de células basales y células escamosas así como psoriasis, pénfigo vulgar, tumores de tejidos blandos, espinalioma, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, carcinoma tiroideo, cáncer de lengua, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer vaginal, diversos tumores inducidos por virus, como por ejemplo carcinomas inducidos por el virus del papiloma (por ejemplo carcinoma cervical = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV, carcinoma de cérvix), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 HTLV-2, cáncer vulvar, estados o implicaciones verrugosos, etc. En este contexto, los términos "terapia" y "terapéutico" significan preferentemente que tienen al menos cierto efecto fisiológico mínimo después de ser administrados a un organismo vivo. Por ejemplo, un efecto fisiológico después de administrar un compuesto antitumoral "terapéutico" puede ser la inhibición del crecimiento tumoral o una disminución del tamaño del tumor o la prevención de la recurrencia del tumor. Preferentemente, en el tratamiento del cáncer o enfermedades neoplásicas, un compuesto que inhibe el crecimiento de un tumor o reduce el tamaño del tumor o previene la recurrencia del tumor sería considerado como terapéuticamente eficaz. Por consiguiente, el concepto "medicamento antitumoral" significa preferentemente cualquier agente terapéutico que tenga efecto terapéutico contra un tumor, una enfermedad neoplásica o cáncer.
- De acuerdo con una realización preferente alternativa, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención tal como se definen más arriba pueden emplearse para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de pulmón o enfermedades pulmonares, incluyendo el Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA), o fibrosis pulmonar, inflamaciones de tejidos, incluyendo, de forma no exclusiva, formación de tejido fibroso, incluyendo fibrosis quística, meningitis y reacciones de rechazo de injerto o rechazo de trasplante, enfermedades crónicas del sistema respiratorio, incluyendo asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), neumonía y fibrosis pulmonar.
- De acuerdo con una realización preferente alternativa, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención tal como se definen más arriba pueden emplearse para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades infecciosas, preferentemente enfermedades infecciosas virales, retrovirales, bacterianas o protozoológicas. Estas enfermedades infecciosas se seleccionan normalmente entre SIDA, ántrax, encefalitis japonesa, enfermedades infecciosas bacterianas tales como aborto espontáneo (inflamación de la próstata, ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, campylobacter, chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donavansiosis, epiglotitis, tífus, gangrena gaseosa, gonorrea, tularemia, helicobacter pylori, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad del legionario, varicela, condiloma acuminado, citomegalovirus (CMV), dengue, meningoencefalitis estival temprana (ESME), virus del Ébola, resfriados, quinta enfermedad, fiebre aftosa, herpes simplex de tipo I, herpes simplex de tipo II, herpes zóster, VHS, enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoos u hongos, como amebiasis, bilharziasis, enfermedad de Chagas, equinococos, tenia del pescado, ictiosarcocoxitosis (Ciguatera), tenia del zorro, pie de atleta, tenia canina, candidiasis, manchas de hongos de levadura, sarna,

leishmaniasis cutánea, lambliasis (giardiasis), piojos, malaria, microscopía, oncocercosis (ceguera de los ríos), enfermedades fúngicas, tenia bovina, esquistosomiasis, tenia porcina, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniasis visceral, dermatitis del área del pañal o tenia en miniatura, eritema infeccioso, gripe, sarcoma de Kaposi, fiebre de Lassa, leishmaniasis, lepra, listeriosis, borreliosis de Lyme, malaria, infección por el virus Marburg, sarampión, meningitis, incluyendo meningitis bacteriana, molluscum contagiosum, mononucleosis, paperas, Mycoplasma hominis, septicemia neonatal (corioamnionitis), noma, infección por el virus Norwalk, otitis media, paratífus, fiebre glandular de Pfeiffer, peste, neumonía, polio (poliomielitis, cojera infantil), pseudocrup, rabia, síndrome de Reiter, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, salmonella paratífus, salmonella tifus, SARS, escarlatina, herpes, hepatitis, viruela, chancro blando, sífilis, tétanos, fiebre de los tres días, gonorrea, enfermedad de tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), enfermedades virales causadas por citomegalovirus (CMV), virus de orthopox variola, virus de orthopox alastrim, virus de parapox ovis, virus molluscum contagiosum, virus de herpes simplex 1, virus de herpes simplex 2, virus de herpes B, virus varicela zóster, virus de la pseudorrabia, virus citomegálico humano, virus de herpes humano 6, virus de herpes humano 7, virus de Epstein-Barr, virus de herpes humano 8, virus de la hepatitis B, virus de chikungunya, virus de O'nyong'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus GB C, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del mal de Louping, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis B de Japón, virus Powassan, virus FSME, SARS, virus corona asociado con SARS, virus corona humano 229E, virus corona humano Oc43, Torovirus, virus linfotrópico de células T humano de tipo I, virus linfotrópico de células T humano de tipo II, VIH (SIDA), es decir, virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 o virus de inmunodeficiencia humana de tipo 2, virus de la gripe, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Tacaribe, virus Junin, virus Machupo, virus de la enfermedad de Borna, virus Bunyamwera, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la fiebre del mosquito simúlido, virus Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Hazara, virus Khasan, virus Hantaan, virus Seoul, virus Prospect Hill, virus Puumala, virus Dobrava Belgrade, virus Tula, virus sin nombre, virus Marburg del lago Victoria, virus del Ébola del Zaire, virus del Ébola del Sudan, virus del Ébola de Costa de Marfil, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus de la influenza C, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano, virus Indiana de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus Mokola, virus Duvenhage, lyssavirus de murciélago europeo 1 + 2, lyssavirus de murciélago australiano, adenovirus A-F, virus del papiloma humano, virus del condiloma 6, virus del condiloma 11, poliomavirus, virus adenoasociados 2, rotavirus u orbivirus, varicela incluyendo varizela zóster y virus de la malaria, enfermedades infecciosas virales tales como el SIDA, enfermedades infecciosas causadas por condiloma acuminado, verrugas huecas, dengue, fiebre de los tres días, virus del Ébola, resfriados, meningoencefalitis estival temprana (FSME), gripe, herpes, hepatitis, herpes simplex de tipo I, herpes simplex de tipo II, herpes zóster, influenza, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, verrugas, fiebre del Nilo occidental, fiebre amarilla, etc.

De acuerdo con otra realización preferente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades muy relacionadas con las señales de JNK en un sujeto. Estas enfermedades o afecciones muy relacionadas con las señales de JNK en un sujeto se seleccionan preferentemente, de forma no exclusiva, entre afecciones autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cancerosas o tumorales tal como se definen más arriba, diabetes, incluyendo diabetes de tipo 1 o tipo 2, enfermedades inflamatorias tal como se definen más arriba, caída del cabello, incluyendo alopecia areata, enfermedades del pulmón, enfermedades neuronales o neurodegenerativas, enfermedades del hígado, enfermedades de la columna, enfermedades del útero, enfermedades infecciosas (virales) y trastornos depresivos. En el caso de las enfermedades o afecciones muy relacionadas con las señales de JNK, el término "mejoría" puede incluir la supresión o expresión de JNK en caso de sobreexpresión de ésta, y/o la supresión de fosforilación de c-jun, ATF2 o NFAT4 en cualquiera de las enfermedades arriba indicadas, por ejemplo, utilizando al menos una secuencia inhibidora de JNK tal como se define aquí, acoplada con la nueva molécula transportadora de la invención dentro de las definiciones arriba proporcionadas, como un inhibidor competitivo del sitio de unión de c-jun, ATF2 y NFAT4 en una célula. En este contexto específico, el término "modular" también incluye la supresión de complejos heteroméricos y homoméricos de factores de transcripción formados, de forma no exclusiva, por c-jun, ATF2 o NFAT4 y sus compañeros relacionados, por ejemplo el complejo AP-1 formado por c-jun, ATF2 y c-fos. Cuando una enfermedad o afección muy relacionada con señales de JNK tal como se define más arriba está asociada con una sobreexpresión de JNK, dichas secuencias inhibidoras de JNK se pueden introducir en una célula. En algunos casos, "modular" en el contexto de enfermedades o afecciones muy relacionadas con señales de JNK también puede incluir el aumento de la expresión de JNK, por ejemplo empleando un anticuerpo específico de péptidos IB que bloquea la unión de un péptido IB con JNK, previniendo así la inhibición de JNK por el péptido relacionado con IB. La prevención y/o el tratamiento de un sujeto con la composición farmacéutica tal como se da conocer más arriba se puede llevar a cabo normalmente administrando (*in vivo*) una cantidad ("terapéuticamente efectiva") de dicha composición farmacéutica a un sujeto, pudiendo ser dicho sujeto por ejemplo cualquier mamífero, por ejemplo un humano,

un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo o cerdo. El concepto "terapéuticamente efectiva" significa que el componente activo de la composición farmacéutica está en una cantidad suficiente para lograr una mejoría de la enfermedad o afección muy relacionada con señales de JNK tal como se define más arriba. Se pueden hallar otros ejemplos para las demás enfermedades aquí mencionadas.

- 5 Por consiguiente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de afecciones o enfermedades autoinmunes. Las afecciones o enfermedades autoinmunes se pueden dividir en líneas generales en afecciones autoinmunes sistémicas y enfermedades autoinmunes específicas de órganos o localizadas, dependiendo de las características clínico-patológicas principales de cada enfermedad. Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir en las categorías de síndromes sistémicos, incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren, escleroderma, artritis reumatoidea y polimiositis o síndromes locales que pueden ser endocrinológicos (diabetes de tipo I (diabetes mellitus de tipo 1), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, etc.), dermatológicos (pénfigo vulgar), hematológicos (anemia hemolítica autoinmune), neurales (esclerosis múltiple), o pueden implicar prácticamente cualquier masa circunscrita de tejido corporal. Las enfermedades autoinmunes a tratar se pueden seleccionar entre el grupo consistente en enfermedades autoinmunes de tipo I o enfermedades autoinmunes de tipo II o enfermedades autoinmunes de tipo III o enfermedades autoinmunes de tipo IV, por ejemplo esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes de tipo 1 (diabetes mellitus de tipo 1), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades alérgicas de tipo I, enfermedades alérgicas de tipo II, enfermedades alérgicas de tipo III, enfermedades alérgicas de tipo IV, fibromialgia, caída del cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, Myasthenia gravis, neurodermitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), síndrome de Reiter, artritis reumática, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes de tipo II. Si bien hasta ahora no se ha aclarado el modo exacto en el que el sistema inmunológico induce una reacción alérgica contra antígenos, existen diversos descubrimientos con respecto a la etiología. Por consiguiente, la autorreacción se puede deber a una derivación de células T. Un sistema inmunológico normal requiere la activación de células B por células T antes de que las primeras puedan producir anticuerpos en grandes cantidades. Esta necesidad de una célula T puede ser evitada en casos raros, como infección por organismos que producen superantígenos que son capaces de iniciar la activación policlonal de células B, o incluso de células T, mediante unión directa con la subunidad β de los receptores de células T de un modo no específico. Otra explicación deduce enfermedades autoinmunes de un Mimetismo Molecular. Un antígeno exógeno puede compartir similitudes estructurales con determinados antígenos huésped; por tanto, cualquier anticuerpo producido contra este antígeno (que imita los autoantígenos) también puede en teoría, unirse a los antígenos huésped y amplificar la respuesta inmune. La forma más sorprendente de mimetismo molecular se observa en estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A, que comparten antígenos con el miocardio humano, y son responsables de las manifestaciones cardíacas de fiebre reumática.

- La molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención también pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades cardiovasculares, preferentemente seleccionadas entre enfermedades cardíacas y enfermedades cardíacas coronarias, arteriosclerosis, apoplejía, dilatación de la aorta abdominal, tal como hipertensión de aneurisma infrarrenal e infarto de miocardio.

- Adicionalmente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades neuronales o neurodegenerativas seleccionadas, de forma no exclusiva, entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), distonía, epilepsia, enfermedad del nervio óptico, incluyendo glaucoma, infección ocular, esclerosis múltiple, meningitis, enfermedades neuronales causadas por el sistema nervioso o afecciones o enfermedades del sistema nervioso, incluyendo el "corte" o la alteración de axones, como axotomía, dolor, en particular dolor neuropático, derrame cerebral, incluyendo ataque isquémico, y encefalopatía viral.

- 50 La molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención también pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades hepáticas seleccionadas, de forma no exclusiva, entre hepatitis y hepatotoxicidad.

- Adicionalmente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades de la columna seleccionadas, de forma no exclusiva, entre hernias de disco.

De acuerdo con una realización preferente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades del útero seleccionadas, de forma no exclusiva, entre endometriosis.

- 5 De acuerdo con otra realización preferente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de trastornos depresivos mayores, también conocidos como depresión mayor, depresión unipolar, depresión clínica o simplemente depresión.
- 10 De acuerdo con una realización preferente más, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención pueden ser utilizadas para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades digestivas inflamatorias crónicas o no crónicas en un sujeto. Tal como se utiliza aquí, el concepto "enfermedad digestiva inflamatoria crónica o no crónica" indica normalmente enfermedades inflamatorias crónicas o no crónicas pertenecientes al tracto gastrointestinal. Esto incluye enfermedades del esófago, estómago, la primera, 15 segunda, tercera y cuarta parte del duodeno, yeyuno, íleon, complejo ileocecal, intestino grueso (colon ascendente, transversal y descendente), colon sigmoideo y recto. A este respecto están incluidas preferentemente enfermedades digestivas inflamatorias crónicas caracterizadas por una inflamación del colon, como colitis, incluyendo, por ejemplo, colitis ulcerosa, Morbus Crohn (enfermedad de Crohn), colitis por desviación, colitis isquémica, colitis infecciosa, colitis fulminante, colitis química, colitis microscópica, colitis linfocítica, colitis colagenosa, colitis indeterminada y colitis atípica, etc.
- 20

En el contexto arriba indicado, la invención también se refiere al uso de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades o afecciones tal como se mencionan aquí. También 25 incluye en particular el uso de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención para la inoculación o el uso de estos componentes como inoculante. Un método para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de las enfermedades o afecciones arriba mencionadas, o un método de inoculación para prevenir las enfermedades arriba mencionadas, comprende normalmente la administración de la molécula conjugada transportador-carga, la composición 30 farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención arriba descritas a un paciente que las necesite (por ejemplo un paciente que sufra cualquiera de las enfermedades arriba indicadas o muestre síntomas de las mismas), en particular a un ser humano, preferentemente en una "cantidad segura y efectiva" y en una de las formulaciones arriba indicadas tal como se describe más arriba. El modo de administración también puede ser tal como se describe más arriba para las composiciones farmacéuticas o vacunas de la invención arriba 35 descritas.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica de la invención, la vacuna de la invención y la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba pueden ser utilizadas como un medicamento. Este medicamento puede consistir en una composición farmacéutica o una vacuna tal como se muestra más arriba. Puede ser utilizada en aplicaciones médicas en 40 general, preferentemente para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades o afecciones tales como las aquí mencionadas.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se describe más arriba y preferiblemente el constructo transportador de la invención tal como se describe más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas, puede ser utilizada para el transporte de cualquier 45 molécula de carga (preferentemente tal como se define aquí) al interior de células o tejido de un paciente a tratar. En este contexto, la molécula de carga es preferentemente adecuada para una terapia tal como se menciona aquí, en particular para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de enfermedades o afecciones tal como se mencionan aquí, y se puede seleccionar entre cualquier molécula de carga adecuada para ello, de forma especialmente preferente entre cualquier molécula de carga tal como se describe más arriba para cualquiera de los componentes (B), (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención. Por tanto, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba 50 mostradas se puede acoplar a una molécula de carga de dicho tipo utilizando cualquiera de los métodos de acoplamiento descritos en relación con los componentes (A), (B), (C), (D) y/o (E) arriba indicados.

55

De acuerdo con una realización particularmente preferente de este aspecto, la molécula conjugada transportador-carga de la invención y de forma especialmente preferente el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera

de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas puede ser utilizada para el transporte de cualquier molécula de carga tal como se menciona aquí, por ejemplo tal como se describe en relación con cualquiera de los componentes (B), (C), (D) y/o (E), al interior de células, preferentemente al interior de células sanguíneas, de forma especialmente preferente al interior de leucocitos o preferiblemente al interior de células neuronales. El transporte se puede realizar *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. Preferentemente, el transporte se realiza al interior de las células respectivas de un paciente a tratar. Esta dirección de la molécula conjugada transportador-carga de la invención y de forma especialmente preferente del constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) conjugada con una carga tal como se menciona más arriba es particularmente adecuada en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tal como se menciona más arriba. Con este fin, la molécula conjugada transportador-carga de la invención y de forma especialmente preferente el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas se puede administrar tal como se describe más arriba en relación con una composición farmacéutica de la invención o una vacuna de la invención. Además, la molécula conjugada transportador-carga de la invención y de forma especialmente preferente el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas se puede formular como una composición farmacéutica de la invención o una vacuna de la invención tal como se describe más arriba con fines de administración. Las vías de administración son tal como se define más arriba en relación con una composición farmacéutica de la invención o una vacuna de la invención. Alternativamente, la molécula conjugada transportador-carga de la invención y de forma especialmente preferente el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas se puede administrar directamente sin ninguna formulación adicional, es decir "desnuda". De modo similar, las vías de administración son tal como se describen más arriba en relación con una formulación de este tipo.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas, la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención se pueden utilizar en la diagnosis como herramienta diagnóstica, por ejemplo en ensayos (*in vivo* o *in vitro*), por ejemplo en inmunoensayos, para detectar, pronosticar, diagnosticar o controlar diversas condiciones y estados de enfermedad o las afecciones o enfermedades mencionadas.

Por ejemplo, se pueden llevar a cabo inmunoensayos mediante un método que consiste en poner en contacto una muestra derivada de un paciente con una molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba, pudiendo estar dirigidos el componente (B) y/o cualquiera de los componentes (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención contra un componente o compuesto, por ejemplo un componente o compuesto específico (de una célula), contenido en la muestra. Un componente (B) de este tipo o cualquiera de los componentes (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un componente o compuesto de la muestra específico (de una célula), pudiendo consistir dicho componente o compuesto de la muestra específico (de una célula) por ejemplo en un compuesto o componente tal como se describe más arriba en relación con cualquiera de los componentes (B), (C), (D) y/o (E) tal como se definen más arriba. El contacto de la muestra se lleva a cabo normalmente bajo condiciones en las que se puede producir una unión inmuno-específica y a continuación se detecta o mide la cantidad de cualquier unión inmuno-específica por el anticuerpo. En una realización específica, un anticuerpo específico para un componente o compuesto de la muestra específico (de una célula), por ejemplo el componente (B), (C), (D) y/o (E) tal como se define más arriba, puede ser utilizado para analizar una muestra de tejido o suero de un paciente en cuanto a la presencia de dicho componente (B), (C), (D) y/o (E) tal como se define más arriba o una enfermedad asociada con éste. Estas enfermedades pueden incluir enfermedades o afecciones tal como se describen aquí. Los inmunoensayos útiles incluyen, de forma no exclusiva, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como *Western blot*, radioinmunoensayos (RIA), ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, ensayos de fijación de complementos, ensayos inmunorradiométricos e inmunoensayos de proteína A, etc.

Alternativamente se pueden llevar a cabo ensayos (*in vitro*) suministrando la composición farmacéutica de la invención, una vacuna o la molécula conjugada transportador-carga de la invención tal como se define más arriba, o variantes o fragmentos de las mismas dentro de las definiciones arriba proporcionadas, a células diana seleccionadas normalmente, por ejemplo, entre células animales cultivadas, células humanas o microorganismos, y controlando la respuesta celular mediante métodos biofísicos normalmente conocidos por

los especialistas. Las células diana utilizadas normalmente en dichos ensayos pueden ser células cultivadas (*in vitro*) o células *in vivo*, es decir, células que componen los órganos o tejidos de animales o humanos vivos, o microorganismos hallados en animales o humanos vivos. En este contexto son particularmente preferentes los llamados marcadores o etiquetas, que pueden estar contenidos como un componente (B) o cualquiera de los componentes (C), (D) y/o (E) de la molécula conjugada transportador-carga de la invención, pudiendo ser dichos marcadores tal como se definen en general más arriba en relación con la molécula conjugada transportador-carga de la invención, por ejemplo.

De acuerdo con un aspecto final de la presente invención, la presente invención también proporciona *kits*, en particular *kits* de partes que comprenden como componentes individuales o en combinación el constructo transportador de la invención tal como se define más arriba de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) arriba mostradas, la molécula conjugada transportador-carga de la invención, la composición farmacéutica de la invención y/o la vacuna de la invención, y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación de dichos componentes. Estos *kits*, preferentemente *kits* de partes, se pueden aplicar, por ejemplo, para o en cualquiera de las aplicaciones o usos arriba mencionados. Adicionalmente, la presente invención proporciona en particular el uso de *kits* con fines diagnósticos o terapéuticos, en particular para el tratamiento, la prevención o el control de enfermedades o afecciones tal como se da a conocer aquí.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado comúnmente entendido por las personas con una experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o las pruebas de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto regirá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están concebidos como limitativos. Otras características y ventajas de la invención se evidenciarán a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Figuras

Las siguientes figuras están concebidas para ilustrar adicionalmente la invención. No están concebidas para limitar la materia de la invención a las mismas.

Figura 1: representa los resultados de un ensayo de degradación cuantitativa con Proteinasa K que implica varios constructos transportadores con secuencias poli-Arg, mostrando cada uno de ellos un patrón diferente de D- y L-aminoácidos (patrón D/L). Los constructo-transportadores utilizados en este ensayo se denominaron 1 a 6. El patrón D/L diferente de las secuencias se describe utilizando letras mayúsculas y minúsculas. Las mayúsculas en estas secuencias (aminoácidos "R") se refieren a arginina L-enantiomérica (L-Arg) y las letras minúsculas en estas secuencias (aminoácidos "r") se refieren a arginina D-enantiomérica (L-Arg). La sensibilidad a la Proteinasa K se midió en los intervalos de tiempo $t = 0, 10$ y 40 minutos. Los resultados del ensayo de degradación cuantitativa con Proteinasa K se determinaron en base a muestras tomadas en estos intervalos de tiempo específicos. Estas muestras se analizaron utilizando un análisis por espectrometría de masas empleando las intensidades iónicas del material de partida como valores de referencia. En conclusión, cuando la secuencia presenta un tramo de 3 o más L-Arg, el péptido muestra sensibilidad a la Proteinasa K y se degrada. Los péptidos con 2 o menos L-arg cercanos entre sí no se degradan y los resultados son comparables a los de la secuencia D completa o D-TAT (SEQ ID N°: 251), respectivamente D-JNKi.

Figura 2: muestra en una tabla una comparación de cuatro constructo-transportadores diferentes de derivados de D-/L-TAT (denominados L-TAT (SEQ ID N°: 18), r3-TAT (también denominado r3-L-Tat; SEQ ID N°: 20), r3-TATi (también denominado r3-L-TATi; SEQ ID N°: 21), y D-TAT (SEQ ID N°: 251), cada uno con una longitud de 9 aminoácidos, pero con un patrón D/L diferente. El patrón D/L diferente de las secuencias se describe utilizando letras mayúsculas y minúsculas. Las mayúsculas en las secuencias (aminoácidos "R") se refieren a arginina L-enantiomérica (L-Arg) y las letras minúsculas en estas secuencias (aminoácidos "r") se refieren a arginina D-enantiomérica (L-Arg). La tabla mostrada en la Figura 2 ilustra las secuencias de aminoácidos de estos constructos transportadores derivados de TAT con respecto a su peso molecular (M_w) y valores pI.

Figura 3: muestra los resultados de una digestión de constructo-transportadores derivados de TAT en un 10% y un 50% de suero humano a 37°C hasta la degradación completa de estos transportadores derivados de TAT. Los constructos transportadores derivados de TAT son tal como se describen en la Figura 2, estando los constructo-transportadores r3-TAT (también denominado r3-L-Tat; SEQ ID N°: 20), r3-TATi (también denominado r3-L-TATi;

- SEQ ID N°: 21) adicionalmente protegidos en el extremo N con una beta-Alanina. Como se puede ver en la Figura 3, los constructo transportadores D-TAT son resistentes a las proteasas, mientras que los constructo transportadores L-TAT se degradan demasiado pronto *in vivo* para realizar un transporte eficiente al interior de las células. Únicamente los constructos transportadores r3-TAT (también denominado r3-L-Tat; SEQ ID N°: 20), r3-TATi (también denominado r3-L-TATi, SEQ ID N°: 21) muestran una degradación dentro de un límite de tiempo adecuado que permite limitar la estabilidad *in vivo* para aplicaciones terapéuticas.
- 5
- Figura 4:** muestra los resultados de una digestión de constructo transportadores derivados de TAT en un 10% y un 50% de suero humano a 37°C hasta la degradación completa de estos transportadores derivados de TAT bajo implicación de beta-Alanina (b-Ala) en la protección de los péptidos. Por ello se añadió beta-Ala al extremo N de los constructos transportadores derivados de TAT L-TAT como LTATi tal como ya se ha descrito en la Figura 3. Como se puede ver en la Figura 4, la protección N-terminal de los péptidos transportadores con beta-Alanina no conduce a ningún efecto significativo, es decir una mayor estabilidad.
- 10
- Figura 5:** representa los resultados de la internalización dependiente del tiempo (absorción) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC en el interior de células de la línea celular HL-60. Las células HL-60 se incubaron durante 30 minutos, 1, 6 o 24 horas con 10 µM de los transportadores derivados de TAT. Las células se lavaron después dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) y dos veces con PBS. Las células se rompieron por adición de tampón de lisis RIPA. Después se determinó la cantidad relativa de péptido internalizado mediante la lectura de la intensidad de fluorescencia (lector de placas Fusion Alpha; PerkinElmer) de cada extracto, seguida por substracción de fondo y normalización del contenido de proteínas. El constructo transportador r3-L-TAT (SEQ ID N°: 20) mostró una capacidad de internalización tan efectiva como el constructo transportador D-TAT. El constructo transportador r3-L-TATi (SEQ ID N°: 21), que se internalizó de forma dependiente del tiempo, como los dos transportadores anteriores, parece ser menos eficiente pero todavía adecuado, mientras que L-TAT (SEQ ID N°: 18) no se acumula a lo largo de un período de 24 horas.
- 15
- Figura 6:** muestra resultados de una microscopía confocal de células tratadas con transportadores derivados de TAT marcados de forma fluorescente. Las neuronas primarias corticales disociadas de ratas P2 Sprague Dawley se cultivaron durante 12 días en medio neurobasal antes de exponerlas durante 24 horas a 500 nM de los transportadores derivados de TAT marcados con FITC. Las células se lavaron cinco veces con PBS sobre hielo y después se montaron en medio de montaje fluorsave sin fijación previa. Las adquisiciones se realizaron en microscopio metaconfocal LSM510 (Zeiss). Las imágenes se procesaron con *software* LSM510 y se montaron utilizando Adobe photoshop. La visualización se llevó a cabo mediante microscopía confocal de marcado con 500 nM de transportadores FITC (A: verde). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (B: azul). Los constructos transportadores r3-L-TAT (SEQ ID N°: 20) así como D-TAT (SEQ ID N°: 251) y r3-L-TATi (SEQ ID N°: 21) se internalizaron en el citoplasma de las neuronas no estresadas (C: panel fusionado). Sin embargo, después de 24 horas de incubación, el transportador L-TAT (SEQ ID N°: 18) ya no estaba presente.
- 20
- Figura 7:** ilustra la absorción (internalización) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC *in vitro* (10 µM, HepG2 hepatocarcinoma, HCT-116 colon tumoral, 24 h). Los constructos utilizados eran diferentes constructo transportadores derivados de TAT denominados D-TAT (SEQ ID N°: 251) y r3-TATi (también denominado r3-L-TATi, SEQ ID N°: 21), cada uno con una longitud de 9 aminoácidos, pero con un patrón D/L diferente, y los constructos de ensayo r6R3 (SEQ ID N°: 260) y DAK, habiendo sido marcados los constructos adicionalmente con beta-Alanina en su extremo N. Como se puede ver, la absorción más eficiente se produjo en los constructos D-TAT (SEQ ID N°: 251) y r6R3 (SEQ ID N°: 260), seguidos por r3-L-TATi (SEQ ID N°: 21).
- 25
- Figura 8:** muestra la absorción (internalización) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC *in vitro* (10 µM, U937, Linfoma, 24 h). Los constructos utilizados son cuatro constructo transportadores derivados de TAT diferentes (denominados L-TAT, SEQ ID N°: 18), r3-TAT (también denominado r3-L-Tat, SEQ ID N°: 20), r3-TATi (también denominado r3-L-TATi, SEQ ID N°: 21) y D-TAT (SEQ ID N°: 251), cada uno con una longitud de 9 aminoácidos, pero con un patrón D/L diferente. Adicionalmente, el constructo DAK se utilizó para comparación y una muestra de control, que sólo contenía los aminoácidos D, A y K. Como se puede observar, la absorción más eficiente dentro de las células se produjo en los constructos transportadores r3-TAT (SEQ ID N°: 20), r3-TATi (SEQ ID N°: 21) y D-TAT (SEQ ID N°: 251), mientras que L-TAT (SEQ ID N°: 18) mostró una absorción dentro de las células considerablemente más baja.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

- Figura 9:** muestra que la absorción (internalización) del constructo transportador depende de HSPG en una concentración de 500 nM durante 24 horas en células U937, Linfoma. El constructo utilizado para el experimento era D-TAT (SEQ ID N°: 251), con una longitud de 9 aminoácidos y marcado con FITC y en su extremo N con beta-Alanina.
- 5 **Figura 10:** muestra que en células U937 a 500 nM FITC-D-TAT no se observa ninguna salida de los constructos transportadores derivados de TAT marcados con FITC. El constructo utilizado para el experimento era D-TAT (SEQ ID N°: 251), con una longitud de 9 aminoácidos y marcado con FITC.
- 10 **Figura 11:** muestra que a 10 µM FITC-D-TAT se observa una salida de los constructos transportadores derivados de TAT marcados con FITC, y es dependiente de HSPG (U937, linfoma). El constructo utilizado para el experimento era D-TAT (SEQ ID N°: 251), con una longitud de 9 aminoácidos y marcado con FITC y en su extremo N con beta-Alanina.
- 15 **Figura 12:** muestra que se observa una absorción (internalización) y una salida de los constructos transportadores derivados de TAT a 10 µM FITC-D-TAT en líneas no WBC (líneas celulares de leucocitos). El constructo utilizado para el experimento era D-TAT (SEQ ID N°: 251), con una longitud de 9 aminoácidos y marcado con FITC.
- 20 **Figura 13:** muestra experimentos de internalización utilizando constructos transportadores derivados de TAT de fórmula general (I). Como se puede ver en la Figura 13, después de 24 horas de incubación todos los transportadores con la secuencia de consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252; véase más arriba una selección de secuencias potenciales) mostraban una capacidad de internalización superior a la del transportador L-TAT (SEQ ID N°: 18). Se incubaron células HeLa durante 24 horas en placas de 96 pocillos con 10 mM de los transportadores derivados de r3-L-TAT. Las células se lavaron después dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) y dos veces con PBS. Las células se rompieron por adición de tampón de lisis RIPA. Después se determinó la cantidad relativa de péptido internalizado mediante la lectura de la intensidad de fluorescencia (lector de placas Fusion Alpha; PerkinElmer) de cada extracto seguida por substracción de fondo.
- 25 **Figura 14:** muestra experimentos de internalización utilizando constructos transportadores derivados de TAT de fórmula general (I). Como se puede ver en la Figura 14, una posición parece ser crítica para la actividad de transporte máxima y para mejorar la cinética de la actividad de transporte: Y en la posición 2 (péptido n° 91, correspondiente a la SEQ ID N°: 116). En resumen, se incubaron células HeLa durante 2, 6 o 24 horas en placas de 24 pocillos con dosis crecientes de los transportadores derivados de r3-L-TAT (0, 500 nM, 1 mM o 10 mM). Las células se lavaron después dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) y dos veces con PBS. Las células se rompieron por adición de tampón de lisis RIPA. Después se determinó la cantidad relativa de péptido internalizado mediante la lectura de la intensidad de fluorescencia (lector de placas Fusion Alpha; PerkinElmer) de cada extracto seguida por substracción de fondo.
- 30 **Figura 15:** Los transportadores derivados de TAT fluorescentes D-TAT (SEQ ID N°: 251)-FITC o r3-L-TAT (SEQ ID N°: 20)-FITC se dirigen a diferentes poblaciones de leucocitos humanos.
- 35 **A:** D-TAT (SEQ ID N°: 251)-FITC. El porcentaje de células cerradas en los cuadrantes respectivos es el siguiente (indicado en el sentido de las agujas del reloj comenzando por el cuadrante superior izquierdo):
- 40 Monocitos (CD14) 9,24; 19,37; 31,71; 39,68;
Neutrófilos (CD15) 17,03; 13,87; 21,53; 47,57;
Linfocitos T (CD3) 22,7; 11,82; 18,01; 47,46;
Linfocitos B (CD19) 32,40; 2,12; 8,26; 57,22.
- 45 **B:** r3- L-TAT (SEQ ID N°: 20)-FITC. El porcentaje de células cerradas en los cuadrantes respectivos es el siguiente (indicado en el sentido de las agujas del reloj comenzando por el cuadrante superior izquierdo):
- 50 Monocitos (CD14) 6,34; 16,65; 36,24; 40,77;
Neutrófilos (CD15) 11,74; 13,75; 24,76; 49,75;
Linfocitos T (CD3) 20,64; 8,96; 20,04; 50,36;
Linfocitos B (CD19) 27,83; 1,76; 8,48; 61,92.
- 55 **Figura 16:** La tabla indica los valores de fluorescencia medios de transportadores derivados de TAT fluorescentes D-TAT (SEQ ID N°: 251)-FITC o r3-L-TAT (SEQ ID N°: 20)-FITC en cada tipo de célula tal como muestra la Figura 15 (canal FITC).
- 60 **Figura 17:** Absorción de constructos transportadores seleccionados de acuerdo con la presente invención por diferentes tipos de células. La absorción se normaliza frente a D-TAT (SEQ ID N°: 251). HepG2: células de hepatocarcinoma (humano; línea celular no leucocitos); A549: células epiteliales pulmonares (humano; línea celular no leucocitos); Raw: Macrófagos (ratón; línea celular de leucocitos); J77: macrófagos (ratón; línea celular de leucocitos); MDMO: Macrófagos Derivados de Médula Ósea (ratón; leucocitos primarios purificados). * n = 2 experimentos independientes (por duplicado) (excepto en el péptido n° 64 n = 1 por

Figura 18: duplicado); ** n = 2 experimentos (por duplicado) (excepto en el péptido n° 64 n = 2 por duplicado); *** n = 1 experimento (por duplicado). Absorción de constructo transportadores seleccionados de acuerdo con la presente invención por diferentes tipos de células. La absorción se normaliza frente a r₃-L-TAT (SEQ ID N°: 20). HepG2: células de hepatocarcinoma (humano; línea celular no leucocitos); A549: células epiteliales pulmonares (humano; línea celular no leucocitos); Raw: Macrófagos (ratón; línea celular de leucocitos); J77: macrófagos (ratón; línea celular de leucocitos); MDMO: Macrófagos Derivados de Médula Ósea (ratón; leucocitos primarios purificados). * n = 2 experimentos independientes (por duplicado) (excepto en el péptido n° 64 n = 1 por duplicado); ** n = 2 experimentos (por duplicado) (excepto en el péptido n° 64 n = 2 por duplicado); *** n = 1 experimento (por duplicado).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos están concebidos para ilustrar adicionalmente la invención. No están concebidos para limitar la materia de la invención a los mismos.

1. Preparación de constructos transportadores (peptídicos)

Los constructos transportadores (peptídicos) utilizados en estos ejemplos se prepararon utilizando síntesis en fase sólida tal como se describe más arriba. Los constructos utilizados para la identificación del patrón D/L mínimo de constructo transportadores que es sensible a las proteasas fueron, entre otros, las siguientes:

SEQ ID N°	Patrón D/L	Secuencia (extremo N a extremo C)
123	todo L	RRRRRRRRR (secuencia de referencia)
257	todo D	rrrrrrrrr
258	D/L	rRrRrRrRr
259	DD/LL	rrRRrrRRr
260	DDD/LLL (r ₆ R ₃)	rrrRRRrrr
261	DDDD/LLLL	rrrRRRRrr

Los constructos utilizados para los experimentos de absorción (internalización) dentro de diversas células y líneas celulares fueron las siguientes:

Nombre	Secuencia (extremo N a extremo C)
FITC-βA-L-TAT	FITC-βA-RKKRQRRR
FITC-βA-D-TAT	FITC-βA-rrrqrrkkr
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	FITC-βA-rKKRrQRRr
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	FITC-βA-rRRQrKKr
FITC-βA-DAK (ctl)	FITC-βA-DAK (secuencia no transportadora)

A continuación de la síntesis, los constructos se purificaron, se guardaron en forma de una solución 10 mM en agua estéril y se utilizaron así purificados sin ningún tratamiento adicional.

2. Identificación del patrón D/L mínimo que confiere sensibilidad a las proteasas (Proteinasa K)

Para identificar el patrón D/L mínimo de constructo transportadores que es sensible a las proteasas pero confiere una vida media *in vivo* suficientemente larga, se llevó a cabo un ensayo de degradación cuantitativa con Proteinasa K utilizando diversos constructo transportadores con secuencias poli-Arg, presentando cada uno de ellos un patrón diferente de D- y L-aminoácidos. Los constructos transportadores utilizados en este ensayo se prepararon tal como se describe más arriba en el ejemplo 1 y se denominaron 1 a 6.

ID SEQ N°	Patrón	Secuencia (extremo N a extremo C)	Sensibilidad a la proteasa
123	todo L	RRRRRRRRR (secuencia de referencia)	+
257	todo D	rrrrrrrrr	-
258	D/L	rRrRrRrRr	-
259	DD/LL	rrRRrrRRr	-
260	DDD/LLL (r ₆ R ₃)	rrrRRRrrr	+
261	DDDD/LLLL	rrrRRRRrr	+

Los patrones diferentes de las secuencias se describen utilizando letras mayúsculas y minúsculas. Las mayúsculas en estas secuencias 1 a 6 (aminoácidos "R") se refieren a arginina L-enantiomérica (L-Arg) y las letras minúsculas en estas secuencias (aminoácidos "r") se refieren a arginina D-enantiomérica (L-Arg). La sensibilidad a la Proteinasa K se midió en los intervalos de tiempo $t = 0, 10$ y 40 minutos. Los resultados del ensayo de degradación cuantitativa con Proteinasa K se determinaron en base a muestras tomadas en estos intervalos de tiempo específicos. Estas muestras se analizaron utilizando un análisis por espectrometría de masas empleando las intensidades iónicas del material de partida como valores de referencia. En conclusión, cuando la secuencia presenta un tramo de 3 o más L-Arg, el péptido muestra sensibilidad a la Proteinasa K y se degrada. Los péptidos con 2 o menos L-arg cercanos entre sí no se degradan. Los resultados son comparables a los de una secuencia totalmente consistente en aminoácidos D-enantioméricos, por ejemplo D-TAT (SEQ ID N°: 251) o D-JNKi, respectivamente (véase también la Figura 1).

También se llevó a cabo otra comparación utilizando cuatro constructo transportadores de derivados de D-/L-TAT denominados L-TAT (SEQ ID N°: 18), r₃-TAT (también denominado r₃-L-Tat; SEQ ID N°: 20), r₃-TATi (también denominado r₃-L-TATi; SEQ ID N°: 21), y D-TAT (SEQ ID N°: 251), cada uno con un longitud de 9 aminoácidos pero con un patrón D/L diferente. El patrón D/L diferente de las secuencias se describe utilizando letras mayúsculas y minúsculas. Las mayúsculas en las secuencias (aminoácidos "R") se refieren a arginina L-enantiomérica (L-Arg) y las letras minúsculas en estas secuencias (aminoácidos "r") se refieren a arginina D-enantiomérica (L-Arg). La tabla mostrada en la Figura 2 ilustra las secuencias de aminoácidos de estos constructos transportadores derivados de TAT con respecto a su peso molecular (M_w) y valores pl (véase la Figura 2).

La digestión se llevó a cabo en un 10% y un 50% de suero humano a 37°C hasta la degradación completa de estos constructos transportadores derivados de TAT. Como se puede ver en la Figura 3, que muestra los resultados de la digestión de constructo transportadores derivados de TAT, los constructo transportadores D-TAT (SEQ ID N°: 251) son resistentes a las proteasas, mientras que los constructo transportadores L-TAT (SEQ ID N°: 18) se degradan demasiado pronto *in vivo* para realizar un transporte eficiente al interior de las células. Únicamente los constructos transportadores r₃-TAT (también denominado r₃-L-Tat; SEQ ID N°: 20), r₃-TATi (también denominado r₃-L-TATi, SEQ ID N°: 21) muestran una degradación dentro de un límite de tiempo adecuado que permite limitar la estabilidad *in vivo* para aplicaciones terapéuticas.

También se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas del constructo transportador r₃-L-TAT en suero humano. Como resultado, el r₃-L-TAT (SEQ ID N°: 20) se degrada por el extremo C hasta un aminoácido simple en suero humano.

Además, se llevó a cabo una digestión de constructo transportadores derivados de TAT en un 10% y un 50% de suero humano a 37°C hasta la degradación completa de estos transportadores derivados de TAT bajo implicación de beta-Alanina (b-Ala) en la protección de los péptidos. Por ello se añadió beta-Ala al extremo N de los constructos transportadores derivados de TAT L-TAT como LTATi tal como ya se ha descrito en la Figura 3. Los resultados se muestran en la Figura 4. Como se puede ver en la Figura 4, la protección N-terminal de los péptidos transportadores con beta-Alanina no conduce a ningún efecto significativo, es decir una mayor estabilidad.

Resumiendo los anteriores resultados con respecto a su estabilidad *in vivo* y su vida media funcional, la estabilidad de los 4 péptidos derivados de TAT analizada en un 10 y un 50% de SH es la siguiente: D-TAT (SEQ ID N°: 251) > r₃-L-TATi (SEQ ID N°: 21) > r₃-L-TAT (SEQ ID N°: 20) > L-TAT (SEQ ID N°: 18). Por tanto, la vida útil tanto de r₃-L-TAT (SEQ ID N°: 20) como de r₃-L-TATi (SEQ ID N°: 21) se ha incrementado en comparación con L-TAT (SEQ ID N°: 18) y disminuido en comparación con D-TAT (SEQ ID N°: 251). Dado que el suero constituye ~ 50% del volumen sanguíneo, los valores obtenidos de muestras que contenían un 50% de SH son los más relevantes. Los resultados de UPLC-MS sugieren además que la degradación implica exoproteasas que se disocian en el extremo C de TAT. Se supone que la carboxipeptidasa N interviene en la degradación, ya que está constitutivamente activa y presente en una alta concentración (30 µg/ml) en la sangre. Además, la CPN disocia específicamente Lys o Arg en el extremo C de péptidos y proteínas.

3. Absorción (internalización) de péptidos en células y medición de la internalización de péptidos en células

En este experimento se evaluó la capacidad de internalización (absorción) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC *in vitro* con un lector de placas de fluorescencia en líneas celulares HL-60 (Leucemia).

3.1 Muestras de ensayo utilizadas en los experimentos

Los constructos utilizados en este experimento eran cuatro constructo transportadores derivados de TAT diferentes (denominados L-TAT, SEQ ID N°: 18), r3-TAT (también denominado r3-L-Tat, SEQ ID N°: 20), r3-TATi (también denominado r3-L-TATi, SEQ ID N°: 21) y D-TAT (SEQ ID N°: 251), cada uno preparado tal como se describe más arriba. Estos constructos tienen una longitud de 9 aminoácidos, pero un patrón D/L diferente. Además, como control se utilizó el constructo DAK, que no contenía ninguna secuencia transportadora. Los constructos estaban protegidos con beta-Alanina (β A) y marcados con FITC en el extremo N.

5	FITC- β A-L-TAT	FITC- β A-RKKRQRRR
10	FITC- β A-D-TAT	FITC- β A-rrrqrkkkr
	FITC- β A-r ₃ -L-TAT	FITC- β A-rKKRrQRRr
	FITC- β A-r ₃ -L-TATi	FITC- β A-rRRQrRKKr
	FITC- β A-DAK (ctl)	FITC- β A-DAK (secuencia no transportadora)

Los constructos se prepararon tal como se describe más arriba, se purificaron, se guardaron en forma de una solución 10 mM en agua estéril y se utilizaron así purificados sin ningún tratamiento adicional.

15 3.2 Otros constructos transportadores TAT(s2-1)- TAT(s2-96)

También se prepararon otros constructos transportadores TAT(s2-1)- TAT(s2-96) tal como se describe más arriba en relación con los constructos transportadores de la invención. Por tanto, durante la síntesis se utilizaron las siguientes secuencias y grupos protectores (unidos a resina):

TATs2-1:	D-Arg(Pmc)-Ala-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
TATs2-2:	D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Ala-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
TATs2-3:	D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ala-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
TATs2-4:	D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Ala-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
TATs2-5:	D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ala-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
TATs2-6:	D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Ala-D-Arg(Pmc)-RESIN
TATs2-7:	D-Arg(Pmc)-Asp(OBut)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN

- TATs2-8: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Asp(OBut)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-9: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Asp(OBut)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-10: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Asp(OBut)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-11: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Asp(OBut)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)- TATs2-RESIN
- TATs2-12: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Asp(OBut)-D-Arg(Pmc)- TATs2-RESIN
- TATs2-13: D-Arg(Pmc)-Glu(OBut)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-14: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBut)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-15: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OBut)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-16: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Glu(OBut)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-17: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Glu(OBut)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-18: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Glu(OBut)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-19: D-Arg(Pmc)-Phe-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-20: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Phe-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-21: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-22: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Phe-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-23: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Phe-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-24: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Phe-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-25: D-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN

- TATs2-26: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-27: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-28: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-29: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-30: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-31: D-Arg(Pmc)-His(Trt)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-32: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-His(Trt)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-33: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-His(Trt)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-34: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-35: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-His(Trt)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-36: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-His(Trt)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-37: D-Arg(Pmc)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-38: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Ile-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-39: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-40: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Ile-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-41: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-42: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-43: D-Arg(Pmc)-Leu-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-44: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-45: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN

- TATs2-46: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-47: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Leu-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-48: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Leu-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-49: D-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-50: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Met-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-51: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Met-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-52: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Met-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-53: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Met-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-54: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Met-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-55: D-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-56: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-57: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-58: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-59: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-60: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-61: D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-62: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-63: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-64: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN

- TATs2-65: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-66: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-67: D-Arg(Pmc)-Ser(But)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-68: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Ser(But)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-69: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ser(But)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-70: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)Ser(But)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-71: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ser(But)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-72: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Ser(But)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-73: D-Arg(Pmc)-Thr(But)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-74: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Thr(But)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-75: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(But)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-76: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)Thr(But)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-77: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Thr(But)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-78: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Thr(But)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-79: D-Arg(Pmc)-Val-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-80: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Val-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-81: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Val-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN

- TATs2-82: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Val-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-83: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Val-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-84: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-85: D-Arg(Pmc)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-86: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-87: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-88: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Trp(Boc)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-89: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-90: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Trp(Boc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-91: D-Arg(Pmc)-Tyr(But)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-92: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Tyr(But)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-93: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(But)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-94: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Tyr(But)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-95: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Tyr(But)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-RESIN
- TATs2-96: D-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Tyr(But)-D-Arg(Pmc)-RESIN

3.3 Materiales y métodos para experimentos de absorción

a) Línea celular

- 5 La línea celular utilizada para este experimento fue HL-60 (Ref. CCL-240, ATCC, Lote 116523).

b) Medio y placas de cultivo

RPMI (Ref. 21875-091, Invitrogen, Lote 8296) o DMEM (Ref. 41965, Invitrogen, Lote 13481) complementado el 05.05.2008 con:

- 10 10% FBS (Ref. A64906-0098, PAA, Lote A15-151): descomplementado a 56°C, 30 min, el 04.04.2008.
 Piruvato de sodio 1 mM (Ref. S8636, Sigma, Lote 56K2386).
 Penicilina (100 unidades/ml)/estreptomocina (100 mg/ml) (Ref. P4333, Sigma, Lote 106K2321).

PBS 10X (Ref. 70011, Invitrogen, Lote 8277): diluido a 1X con H₂O estéril.
 Tripsina-0,05% EDTA (Ref. L-11660, PAA, Lote L66007-1194).
 Placas de cultivo de 6 pocillos (Ref. 140675, Nunc, Lote 102613).
 Placas de cultivo de 24 pocillos (Ref. 142475, Nunc, Lote 095849).
 5 Placas de cultivo de 96 pocillos (Ref. 167008, Nunc, Lote 083310).
 Placas de 96 pocillos para dosificación de proteínas (Ref. 82.1581, Sarstedt).
 Placas de 96 pocillos para medición de fluorescencia (Ref. 6005279, Perkin Elmer)

c)Soluciones

Solución de revestimiento de Poli-D-lisina (Sigma P9011, Lote 095K5104): dilución final 25 µg/ml en PBS 1 x.

10 Tampón de lavado ácido: glicina 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 3,0.

Tampón de lisis Ripa: NaH₂PO₄ 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, EDTA 1 mM pH 8,0, Na₃VO₂ 200 µM, 0,1% SDS, 1X cóctel inhibidor de proteasa (Ref. 11873580001, Roche, Lote 13732700).

d)Lector de placas de microscopía y fluorescencia

15 Las células se observaron y recontaron utilizando un microscopio invertido (Axiovert 40 CFL; Zeiss; 20X).La fluorescencia se leyó con el lector de placas Fusion Alpha (Perkin Elmer).

e)Método

20 La internalización de péptidos marcados con FITC se estudió en células de suspensión. Las células se dispusieron en placas revestidas de poli-DL-lisina en una concentración de 1 x 10⁶ células/ml. Las placas se incubaron después durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂ y una humedad relativa del 100% antes de la adición de una concentración conocida de péptido. Después de la adición de péptidos, las células se incubaron durante 30 minutos, 1, 6 o 24 horas a 37°C, 5% CO₂ y una humedad relativa del 100%. Las células se lavaron después dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) con el fin de eliminar el péptido adsorbido en la superficie celular (véase Kameyama y col., (2007), *Biopolymers*, 88, 98-107). El tampón ácido se utilizó porque los péptidos ricos en aminoácidos básicos se absorben fuertemente en las superficies celulares, lo que frecuentemente resulta en una sobrestimación de péptidos internalizados. Por tanto, el lavado de células utilizando un tampón ácido se empleó para eliminar los péptidos adsorbidos en la superficie celular. El lavado ácido se llevó a cabo en la determinación de la absorción celular de conjugados de péptidos de permeación, seguido por dos lavados con PBS. Las células se rompieron por adición del tampón de lisis RIPA. La cantidad relativa de péptido internalizado se determinó después por fluorescencia tras substracción de fondo y normalización del contenido de proteínas.

30 Por tanto, los pasos son:

1. Cultivo celular.
2. Lavado ácido y extractos celulares.
3. Análisis de internalización de péptidos con un lector de placas defluorescencia.

35 **f)Cultivo celular y tratamiento con péptidos**

(1) Las placas de cultivo de 6 pocillos se revistieron con 3 ml de Poli-D-Lys (Sigma P9011; 25 µg/ml en PBS), las placas de 24 pocillos con 600 µl y las placas de 96 pocillos con 125 µl, y se incubaron durante 4 horas a 37°C, CO₂ 5% y una humedad relativa del 100%.

40 (2) Cuatro horas después, las placas se lavaron dos veces con 3,5 ml de PBS, 700 µl o 150 µl de PBS para las placas de 6, 24 y 96 pocillos, respectivamente.

(3) Las células se dispusieron en las placas en 2,4 ml de medio (RPMI) en densidades de 1.000.000 células/ml para células en suspensión. Después de la inoculación, las placas se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y una humedad relativa del 100% durante 24 horas antes de la adición del péptido. Las células adherentes debían estar en una densidad del 90 - 95% el día del tratamiento y se dispusieron en placas con DMDM:

Pocillos	Superficie de cultivo (cm ²)	Medio	Nº de células adherentes	Nº de células en suspensión
96 pocillos	0,3	100 - 200 µl	8.000 - 30.000	100.000
24 pocillos	2	500 - 1000 µl	100.000 - 200.000	500.000 -1.000.000
35 mm (P35) / 6 pocillos	10	2,4 ml	250.000 - 2.100.000	2.400.000
60 mm (P60)	20	3,5 ml	15x10 ⁵	1.000.000/ml
10 cm (P100)	60		15 – 60x10 ⁵	

(4) Las células se trataron con la concentración deseada de péptido marcado con FITC (solución madre en una concentración 10 mM en H₂O),

(5) Después de la adición de los péptidos, las células se incubaron durante 0 a 24 horas (por ejemplo 30 minutos, 1, 6 o 24 horas) a 37°C, 5% CO₂ y una humedad relativa del 100%.

5 *Lavado ácido y extractos celulares:*

(6) Los extractos se enfriaron sobre hielo.

Células en suspensión (o células que no se unen bien en la placa):

- Las células se transfirieron a "Falcon 15 ml". Para recuperar el máximo de células, la placa se lavó con 1 ml de PBS.
- 10 • Las células se recogieron durante 2 min a 2400 rpm máx.
- Las células se suspendieron en 1 ml de PBS frío.
- Las células se transfirieron a un "tubo Eppendorf" revestido (revestido con 1 ml de poli-L-Lys durante 4 horas y lavado dos veces con 1 ml de PBS).
- 15 • Después se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de lavado ácido frío y se centrifugaron durante 2 minutos a 2.400 rpm máx., teniendo cuidado con la dispersión de las células en el "ependorf".
- Luego se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío para neutralizar.
- A continuación, se añadieron 50 µl de tampón de lisis RIPA.
- Después se incubaron durante 30 minutos - 1 hora sobre hielo con agitación.

Células adherentes:

- 20 • Se lavaron tres veces con 3 ml, 1 ml o 200 µl (para placas de 6, 24 o 96 pocillos, respectivamente) de tampón de lavado ácido frío, teniendo cuidado con las células que se despegaban de la placa.
- Se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío (para placas de 6, 24 o 96 pocillos, respectivamente) para neutralizar.
- A continuación, se añadieron 50 µl de tampón de lisis RIPA.
- 25 • Después se incubaron durante 30 minutos - 1 hora sobre hielo con agitación.
- Las células se rasparon con un rascador en frío. Las placas de 24 y 96 pocillos se centrifugaron directamente a 4.000 rpm a 4° durante 15 minutos para eliminar los desechos celulares. Después, los sobrenadantes (100 o 50 ml respectivamente para las placas de 24 o 96 pocillos) se transfirieron directamente a una placa de 96 pocillos oscura. Las placas se leyeron mediante un lector de placas de fluorescencia (Fusion Alpha, Perkin Elmer).
- 30 • El lisado se transfirió a un "ependorf" revestido (revestido con 1 ml de poli-D-Lys durante 4 horas y lavado dos veces con 1 ml de PBS).
- Las células lisadas se centrifugaron después durante 30 minutos a 10.000 g a 4°C para eliminar los desechos celulares.
- 35 • El sobrenadante se eliminó y el resto se conservó a -80°C en un "tubo Eppendorf" revestido (revestido con 1 ml de poli-L-Lys durante 4 horas y lavado dos veces con 1 ml de PBS).

Análisis de internalización de péptidos con un lector de placas de fluorescencia:

- (7) El contenido de cada extracto de proteínas se determinó mediante un ensayo BCA estándar (Kit N° 23225, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 40 (8) La fluorescencia relativa de cada muestra se determinó después de leer 10 µl de cada muestra en un lector de placas de fluorescencia (Fusion Alpha, Perkin Elmer), sustracción de fondo y normalización por concentración de proteínas.

3.4 Experimentos y análisis de internalización

45 La internalización (absorción) dependiente del tiempo de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC en células de la línea celular HL-60 se llevó cabo con los materiales y métodos arriba descritos.

50 En resumen, las células HL-60 se incubaron durante 30 minutos, 1, 6 o 24 horas con 10 µM de los transportadores derivados de TAT. Después, las células se lavaron dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) y dos veces con PBS. Las células se rompieron mediante la adición del tampón de lisis RIPA. La cantidad relativa de péptido internalizado se determinó después mediante lectura de la fluorescencia (lector de placas Fusion Alpha, Perkin Elmer) de cada extracto, seguida por sustracción de fondo y normalización del contenido de proteínas. El constructo transportador 3-L-TAT_i mostró una capacidad de internalización tan efectiva como el constructo transportador D-TAT. El constructo transportador 3-L-TAT_i,

que se internalizaba de forma dependiente del tiempo, como los dos transportadores anteriores, parece ser menos eficiente pero todavía adecuada, mientras que L-TAT no se acumula durante un período de 24 horas (véase la Figura 5).

5 Además, se llevó a cabo una microscopía confocal con células tratadas con constructo transportadores derivados de TAT marcados de forma fluorescente tal como se describen más arriba. Las neuronas primarias corticales disociadas de ratas P2 Sprague Dawley se cultivaron durante 12 días en medio neurobasal antes de exponerlas durante 24 horas a 500 nM de los transportes derivados de TAT marcados con FITC. Las células se lavaron cinco veces con PBS sobre hielo y después se montaron en medio de montaje fluorsave sin fijación previa. Las adquisiciones se realizaron en microscopio metaconfocal LSM510 (Zeiss). Las imágenes se procesaron con *software* LSM510 y se montaron utilizando Adobe photoshop. La visualización se llevó a cabo mediante microscopía confocal de marcado con 500 nM de transportadores FITC (A: verde). Los núcleos se tiñeron mediante Hoechst (B: azul). Los constructos transportadores r3-L-TAT así como D-TAT y r3-L-TATi se internalizaron en el citoplasma de las neuronas no estresadas (C: panel fusionado). Sin embargo, después de 24 horas de incubación, el transportador L-TAT ya no estaba presente.

15 **3.5 Otros experimentos y análisis de internalización**

La internalización (absorción) dependiente del tiempo de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC en células de la línea celular HL-60 se llevó cabo además con los materiales y métodos arriba descritos utilizando secuencias de los transportadores derivados de D-TAT marcados con 96-FITC. Estas secuencias se indican abajo en la Tabla 6.

20

25

30

35

40

45

50

Tabla 6

SEQ ID NO:	Péptido n°: abreviatura en Figuras 13 y 14											
20	r3-L-TAT	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
26	1	H2N	dR	A	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
27	2	H2N	dR	K	A	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
28	3	H2N	dR	K	K	A	dR	Q	R	R	dR	CONH2
29	4	H2N	dR	K	K	R	dR	A	R	R	dR	CONH2
30	5	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	A	R	dR	CONH2
31	6	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	A	dR	CONH2
32	7	H2N	dR	D	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
33	8	H2N	dR	K	D	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
34	9	H2N	dR	K	K	D	dR	Q	R	R	dR	CONH2
35	10	H2N	dR	K	K	R	dR	D	R	R	dR	CONH2
36	11	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	D	R	dR	CONH2
37	12	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	D	dR	CONH2
38	13	H2N	dR	E	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
39	14	H2N	dR	K	E	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
40	15	H2N	dR	K	K	E	dR	Q	R	R	dR	CONH2
41	16	H2N	dR	K	K	R	dR	E	R	R	dR	CONH2
42	17	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	E	R	dR	CONH2
43	18	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	E	dR	CONH2
44	19	H2N	dR	F	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
45	20	H2N	dR	K	F	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
46	21	H2N	dR	K	K	F	dR	Q	R	R	dR	CONH2
47	22	H2N	dR	K	K	R	dR	F	R	R	dR	CONH2
48	23	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	F	R	dR	CONH2
49	24	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	F	dR	CONH2
50	25	H2N	dR	R	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
51	26	H2N	dR	K	R	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
52	27	H2N	dR	K	K	K	dR	Q	R	R	dR	CONH2
53	28	H2N	dR	K	K	R	dR	R	R	R	dR	CONH2
54	29	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	K	R	dR	CONH2
55	30	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	K	dR	CONH2
56	31	H2N	dR	H	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
57	32	H2N	dR	K	H	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
58	33	H2N	dR	K	K	H	dR	Q	R	R	dR	CONH2
59	34	H2N	dR	K	K	R	dR	H	R	R	dR	CONH2

60	35	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	H	R	dR	CONH2
61	36	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	H	dR	CONH2
62	37	H2N	dR	I	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
63	38	H2N	dR	K	I	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
64	39	H2N	dR	K	K	I	dR	Q	R	R	dR	CONH2
65	40	H2N	dR	K	K	R	dR	I	R	R	dR	CONH2
66	41	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	I	R	dR	CONH2
67	42	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	I	dR	CONH2
68	43	H2N	dR	L	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
251	44 (D-TAT)	H2N	dR	dR	dR	dQ	dR	dR	dK	dK	dR	CONH2
21	45 (r3-L-TATi)	H2N	dR	R	R	Q	dR	R	K	K	dR	CONH2
20	46 (r3-L-TAT)	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
18	47 (L-TAT)	H2N	R	K	K	R	R	Q	R	R	R	CONH2
73	48	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	L	dR	CONH2
74	49	H2N	dR	M	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
75	50	H2N	dR	K	M	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
76	51	H2N	dR	K	K	M	dR	Q	R	R	dR	CONH2
77	52	H2N	dR	K	K	R	dR	M	R	R	dR	CONH2
78	53	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	M	R	dR	CONH2
79	54	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	M	dR	CONH2
80	55	H2N	dR	N	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
81	56	H2N	dR	K	N	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
82	57	H2N	dR	K	K	N	dR	Q	R	R	dR	CONH2
83	58	H2N	dR	K	K	R	dR	N	R	R	dR	CONH2
84	59	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	N	R	dR	CONH2
85	60	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	N	dR	CONH2
86	61	H2N	dR	Q	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
87	62	H2N	dR	K	Q	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
88	63	H2N	dR	K	K	Q	dR	Q	R	R	dR	CONH2
89	64	H2N	dR	K	K	R	dR	K	R	R	dR	CONH2
90	65	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	Q	R	dR	CONH2
91	66	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	Q	dR	CONH2
92	67	H2N	dR	S	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
93	68	H2N	dR	K	S	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
94	69	H2N	dR	K	K	S	dR	Q	R	R	dR	CONH2
95	70	H2N	dR	K	K	R	dR	S	R	R	dR	CONH2
96	71	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	S	R	dR	CONH2
97	72	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	S	dR	CONH2
98	73	H2N	dR	T	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
99	74	H2N	dR	K	T	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
100	75	H2N	dR	K	K	T	dR	Q	R	R	dR	CONH2
101	76	H2N	dR	K	K	R	dR	T	R	R	dR	CONH2
102	77	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	T	R	dR	CONH2
103	78	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	T	dR	CONH2
104	79	H2N	dR	V	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
105	80	H2N	dR	K	V	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
106	81	H2N	dR	K	K	V	dR	Q	R	R	dR	CONH2

107	82	H2N	dR	K	K	R	dR	V	R	R	dR	CONH2
108	83	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	V	R	dR	CONH2
109	84	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	V	dR	CONH2
110	85	H2N	dR	W	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
111	86	H2N	dR	K	W	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
112	87	H2N	dR	K	K	W	dR	Q	R	R	dR	CONH2
113	88	H2N	dR	K	K	R	dR	W	R	R	dR	CONH2
114	89	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	W	R	dR	CONH2
115	90	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	W	dR	CONH2
116	91	H2N	dR	Y	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
117	92	H2N	dR	K	Y	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
118	93	H2N	dR	K	K	Y	dR	Q	R	R	dR	CONH2
119	94	H2N	dR	K	K	R	dR	Y	R	R	dR	CONH2
120	95	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	Y	R	dR	CONH2
121	96	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	Y	dR	CONH2

En esta tabla, los D-aminoácidos están indicados mediante una "d" minúscula delante del residuo de aminoácido correspondiente (dR = D-Arg).

- 5 La síntesis falló lamentablemente por unas pocas secuencias en la primera aproximación debido a razones técnicas. Esta secuencia están abreviadas en la Figura 13 como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 43, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 85, 86, 87, 88, 89 y 90. No obstante, las secuencias restantes se utilizaron en los experimentos de internalización. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y 14.

10 Como se puede ver en la Figura 13, después de 24 horas de incubación todos los transportadores con la secuencia consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252) (véase más arriba una selección de secuencias posibles) mostraban una mayor capacidad de internalización que el transportador L-TAT. Las células HeLa se incubaron durante 24 horas en una placa de 96 pocillos con 10 mM de los transportadores derivados de r3-L-TAT. Después, las células se lavaron dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) y dos veces con PBS. Las células se rompieron mediante la adición del tampón de lisis RIPA. La cantidad relativa de péptido internalizado se determinó después mediante lectura de la intensidad de fluorescencia (lector de placas Fusion Alpha; Perkin Elmer) de cada extracto seguida por substracción de fondo.

15 Como se puede ver en la Figura 14, una posición parece ser crítica para la actividad de transporte máxima y para mejorar la cinética de la actividad de transporte: Y en la posición 2 (péptido n° 91, correspondiente a la SEQ ID N°: 116). En resumen, células HeLa se incubaron durante 2, 6 o 24 horas en placas de 24 pocillos con dosis crecientes de los transportadores derivados de r3-L-TAT (0, 500 nM, 1 mM o 10 mM). Las células se lavaron después dos veces con un tampón ácido (glicina 0,2M, NaCl 0,15M, pH 3,0) y dos veces con PBS. Las células se rompieron mediante adición de tampón de lisis RIPA. Después se determinó la cantidad relativa de péptido internalizado mediante la lectura de la intensidad de fluorescencia (lector de placas Fusion Alpha; PerkinElmer) de cada extracto seguida por substracción de fondo. La conclusión de estos experimentos es la siguiente:

- 25 • Después de 24 horas de incubación, todos los transportadores con la secuencia consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252) (véase en la Tabla 1 una selección de secuencias posibles) mostraban una mayor capacidad de internalización que el transportador L-TAT (Figura 13). Estos resultados validan completamente la secuencia de consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252).
- 30 • Una posición es crítica para la actividad de transporte máxima (Figura 13): Y en la posición 2 (secuencia 91 correspondiente a la SEQ ID N°: 116).
- Una posición es crítica para mejorar la cinética de la actividad de transporte (Figura 14): Y en la posición 2 (secuencia 91, correspondiente a la SEQ ID N°: 116).

35 Por consiguiente, son preferentes las secuencias derivadas de TAT mostradas en la Tabla 1 que presentan una Y en la posición 2, en particular cuando la secuencia de acuerdo con la fórmula genérica (I) presenta 9 aa y tiene la secuencia consenso rXXXrXXXr (SEQ ID N°: 252).

4. Determinación de la concentración intracelular de constructos transportadores específicos a continuación de la absorción (internalización) de estos péptidos en células U937

De acuerdo con otro experimento se determinó la concentración de constructo transportadores específicos a continuación de la absorción (internalización) de estos péptidos dentro de células U937. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando las secuencias RKKRRQRRR (L-TAT), rrrqrrkkr (D-TAT), rKKRrQRRr (r3-L-TAT) y rYKRrQRRr (XG-91), en cada caso en una concentración de 10 µM.

10 µM	2 h	4 h	6 h	24 h
RKKRRQRRR (L-TAT) (SEQ ID NO: 18)	1,20	1,38	1,07	0,5
rrrqrrkkr (D-TAT) (SEQ ID NO: 251)	2,00	2,24	3,55	17,3
rKKRrQRRr (r3-L-TAT) (SEQ ID NO: 20)	2,34	3,16	3,56	11,2
rYKRrQRRr (XG-91, secuencia 91 correspondiente a la SEQ ID NO: 116)	3,16	4,27	4,68	50

5

Sorprendentemente, la acumulación de rYKRrQRRr (XG-91, secuencia 91 correspondiente a la SEQ ID NO: 116) muestra una acumulación extrema en la célula, que es incluso considerablemente mayor que la concentración del constructo transportador en el medio o la concentración media de aproximadamente 20 µM prevista para el constructo D-TAT. Esto destaca la importancia de los constructos transportadores de acuerdo con la fórmula genérica (I), en particular los constructos transportadores que comprenden una secuencia derivada de TAT tal como muestra la Tabla 1, que presenta una Y en la posición 2 y que preferentemente tiene 9 aa y la secuencia consenso rXXXrXXXr (SEQ ID NO: 252).

10

5. Absorción (internalización) de péptidos dentro de células y medición de la internalización de péptidos en las líneas celulares HepG2 (hepatocarcinoma), HCT-116 (colon tumoral), U937 (Linfoma), en líneas celulares WBC (líneas celulares de leucocitos) y líneas celulares no WBC

15

En estos experimentos, la capacidad de internalización (absorción) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC *in vitro* se evaluó con un lector de placas de fluorescencia en otras líneas celulares HepG2 (hepatocarcinoma), HCT-116 (colon tumoral), U937 (Linfoma), en líneas celulares WBC (*white blood cells* - líneas celulares de leucocitos) y líneas celulares no WBC.

20

Muestras de ensayo y condiciones aplicadas en estos experimentos

Los constructos y condiciones utilizados en este experimento fueron tal como se describe más arriba para el experimento 3 con las siguientes enmiendas y líneas celulares:

a) Absorción (internalización) de constructo transportadores derivados de TAT marcadas con FITC *in vitro* (10 µM, HepG2 hepatocarcinoma, HCT-116 colon tumoral, 24 h)

25

Los constructos utilizados fueron diferentes constructo transportadores derivados de TAT denominados D-TAT y r3-TATi (también designado r3-L-TATi), D-TAT, cada uno con una longitud de 9 aminoácidos pero con un patrón D/L diferente, y los constructos r₆R₃ y DAK, habiendo sido marcados los constructos adicionalmente con beta-Alanina en su extremo N. La Tabla 7 muestra los resultados. Como se puede ver en la Figura 7, la absorción más eficaz se produjo en los constructos D-TAT y r₆R₃, seguidos por r₃-L-TATi.

30

b) Absorción (internalización) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC *in vitro* (10 µM, U937, Linfoma, 24 h)

Los constructos utilizados fueron cuatro constructo transportadores derivados de TAT diferentes (denominados L-TAT, r3-TAT (también designado r3-L-Tat), r3-TATi (también designado r3-L-TATi) y D-TAT), cada uno con una longitud de 9 aminoácidos, pero con un patrón D/L diferente. Adicionalmente, el constructo DAK se utilizó para comparación y una muestra de control, que no contenía ningún péptido. Los resultados se muestran en la Figura 8. Como se puede ver en la Figura 8, la absorción de los constructos transportadores r3-TAT, r3-TATi y D-TAT en las células fue más eficiente, mientras que L-TAT mostró una absorción en las células considerablemente menor.

35

c) Dependencia de HSPG de la absorción (internalización) del constructo transportador D-TAT

40

Se llevó a cabo un experimento para determinar si la absorción (internalización) del constructo transportador D-TAT depende de HSPG. Según se comprobó, la absorción (internalización) del constructo transportador D-TAT depende de HSPG en una concentración de 500 nM a lo largo de 24 horas en células U937, Linfoma (véase también la Figura 9). El constructo utilizado para el experimento fue D-TAT, que tenía una longitud de 9 aminoácidos y estaba marcado con FITC y en su extremo N con beta-Alanina.

45

d) Salida de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC de células U937 (linfoma)

Se llevó a cabo otro experimento para determinar si los constructos transportadores derivados de TAT marcados con FITC salen de células U937. El resultado de este experimento indica que no se observa ninguna salida de células U937 a 500 nM FITC-D-TAT (véase la Figura 10). El constructo utilizado para el experimento fue D-TAT (SEQ ID N°: 251), que tenía una longitud de 9 aminoácidos y estaba marcado con FITC y en su extremo N con beta-Alanina.

Además, se pudo determinar que se observa una salida de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC a 10 μ M FITC-D-TAT, y depende de HSPG en células U937 (linfoma) (véase la Figura 11). El constructo utilizado para el experimento fue el nuevo D-TAT (SEQ ID N°: 251), como más arriba.

e) Absorción (internalización) y salida de los constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC a 10 μ M FITC-D-TAT en líneas no WBC (líneas celulares de leucocitos)

En otro experimento se observó una absorción (internalización) y una salida de los constructos transportadores derivados de TAT marcados con FITC a 10 μ M FITC-D-TAT en líneas no WBC (líneas celulares de leucocitos) (véase la Figura 12). El constructo utilizada para el experimento fue D-TAT (SEQ ID N°: 251), que tenía una longitud de 9 aminoácidos y estaba marcado con FITC y en su extremo N con beta-Alanina.

f) Conclusiones

Como conclusión de los experimentos de absorción (internalización) arriba mostrados y tal como se puede ver más arriba en las figuras, la absorción (internalización) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC que contienen o que están compuestos exclusivamente por D-aminoácidos es lineal a lo largo de varias horas *in vitro*. Además, a las 24 horas, la absorción (internalización) de estos constructos transportadores derivados de TAT marcados con FITC *in vitro* llega a concentraciones intracelulares 50 - 100 veces mayores que L-TAT. Adicionalmente, la absorción (internalización) de constructo transportadores derivados de TAT marcados con FITC que contienen o que están compuestos exclusivamente por D-aminoácidos por líneas WBC (líneas celulares de leucocitos) es 10 - 50 veces más eficiente que en el caso de líneas no WBC *in vitro*. En todos estos experimentos se observó una salida eficiente en una alta concentración intracelular, pero no se observó en bajas concentraciones en WBC.

6. Síntesis de moléculas conjugadas transportador-carga citotóxicas D-Tat-cisplatino, r3-L-TAT-cisplatino y r3-L-TATi-cisplatino

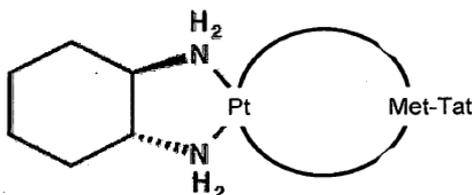
6.1 Síntesis de péptidos

La secuencia de péptidos de D-TAT (rrrqrkkkr; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRRr; SEQ ID N°: 20) y r3-L-TATi (rRRQrRKKr; SEQ ID N°: 21), incluyendo una metionina adicional, se sintetiza manualmente en 0,4 mmol de resina de Fmoc-Amida-AM utilizando química Fmoc. El péptido se disocia después de la resina con TFA, se filtra bajo presión reducida, se precipita con éter frío y se seca. El péptido crudo se purifica por HPLC semipreparativa y se caracteriza mediante ESI-MS.

6.2 Alquilación de péptido en Cisplatino

5,0 μ mol de Cisplatino (1,5 mg en 3,0 ml de tampón de Cloruro de Sodio, pH 5,0) se disuelven en 2,0 ml de tampón de Na_2HPO_4 10 mM (pH 7,4), y el valor pH de la solución es 7,0. Después se preparan 5,0 μ mol de péptido de D-TAT-Metionina (o de péptido r3-L-TAT-Metionina o péptido r3-L-TATi-Metionina) en tampón Na_2HPO_4 10 mM (pH 7,4) y el valor pH de la solución es 6,0. Luego se inicia la alquilación mezclando dos soluciones a temperatura ambiente en oscuridad (el valor pH de la mezcla es 7,0). Después de 0 h, 1 h, 3 h y 24 h, el producto se analiza por RP-HPLC analítica, y se caracteriza mediante ESI-MS. Finalmente, la solución de pico prevista se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa y se liofiliza.

7. Síntesis de moléculas conjugadas transportador-carga D-Tat-Oxaliplatino, r3-L-TAT-Oxaliplatino y r3-L-TATi-Oxaliplatino



7.1 Síntesis de péptidos (D-Tat-Metionina, r3-L-TAT-Metionina y r3-L-TATi-Metionina)

- Las secuencias de péptidos de D-TAT (rrrqrkk; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRR; SEQ ID N°: 20) y r3-L-TATi (rRRQrRKK; SEQ ID N°: 21) se sintetizan manualmente en 0,23 mmol de resina de amida Fmoc-Rink utilizando química Fmoc. Por tanto, cada aminoácido desde Gly C-terminal hasta I-Met N-terminal (forma L) se une secuencialmente a la resina con un ciclo de desprotección de F-moc (20% de piperidina en DMF) y acoplamiento de aminoácidos (HBTU/HOBt/DIEA en activación de DMF). El péptido se disocia de la resina con TFA (2 h en presencia de un 2,5% de dH₂O, un 0,5% de EDT y un 2,0% de TIS), se filtra a presión atmosférica, se reduce en volumen mediante burbujeo de N₂, se precipita con éter frío y se seca al aire. El péptido crudo se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa y se caracteriza mediante ESI-MS.

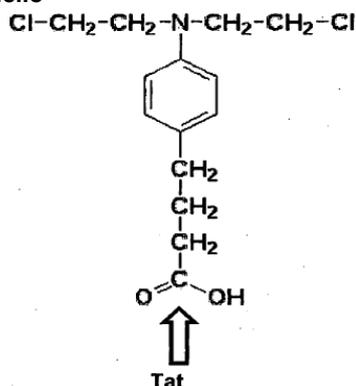
7.2 Alquilación de péptido a oxaliplatino

- En primer lugar se preparan 10 μmol de Oxaliplatino, formulado como Eloxatin® (Oxaliplatino 4,0 mg, lactosum monohydricum 36,0 mg) en 5,0 ml de tampón Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7,4), 10 μmol de péptido de D-Tat-Metionina (o de péptido r3-L-TAT-Metionina o de péptido r3-L-TATi-Metionina) se prepara en dH₂O 5,0 ml. La alquilación comienza mezclando las dos soluciones a temperatura ambiente. La reacción continúa después a 37°C y se controla mediante RP-HPLC analítica a 214 y 280 nm a lo largo de 24 horas. El pico diana se caracteriza mediante ESI-MS y se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa seguida de liofilización.

7.3 Condiciones de ensayo

- Aquí se determinan los efectos de un tratamiento con concentraciones crecientes de una molécula conjugada de la invención (D-Tat-oxaliplatino, r3-L-TAT-oxaliplatino o r3-L-TATi-oxaliplatino) en la supervivencia de MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano) y SiHa (línea celular de carcinoma escamoso de cuello uterino). Los efectos de D-Tat-oxaliplatino, r3-L-TAT-oxaliplatino o r3-L-TATi-oxaliplatino se comparan con el conjugado L-Tat-oxaliplatino y dos medicamentos anticáncer no conjugados (Oxaliplatino y Cisplatino). Las células de cada línea celular (10.000 células por pocillo) se disponen en placas de 96 pocillos (volumen total 200 μl de MEM complementado con un 10% de FBS, un 1% de L-glutamina, un 1% de piruvato de Na, un 1% de aminoácidos no esenciales para células MCF-7 y de MEM/Earle complementado con un 10% de FBS, un 1% de piruvato de Na, un 1% de aminoácidos no esenciales para células SiHa). Se analizan de 6 a 10 concentraciones diferentes de cada sustancia de ensayo. Las células de control no se tratan. Las células se incuban a 37°C durante 24 horas antes del tratamiento con la sustancia de ensayo. Cada experimento se lleva a cabo por triplicado. Después del tratamiento, las células se incuban durante 96 horas a 37°C. Los efectos de las moléculas de ensayo en la supervivencia de estas líneas celulares (actividad citotóxica *in vitro*) se miden mediante el ensayo MTT. Después se añaden a cada pocillo 20 μl de una solución de 5 mg/ml de Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo filtrado por 0,22 μm (MTT, Sigma, N° Ref. 88415) en solución salina tampón de fosfato (PBS, CHUV) y la placa se incuba durante 4 horas a 37°C. El sobrenadante se retira y los cristales de formazano se disuelven con DMSO (200 μl por pocillo). La absorbancia (OD) se mide en un lector de microplacas a 595 nm (Expert Plus Reader, Asys Hitech). La IC₅₀ (concentración del medicamento que inhibe un 50% del crecimiento celular) de las sustancias de ensayo se calcula utilizando *software* Prism.

8. Síntesis de las moléculas conjugadas transportador-carga citotóxicas D-Tat-Clorambucilo, r3-L-TAT-Clorambucilo y r3-L-TATi-Clorambucilo



- ### 8.1 Síntesis de moléculas conjugadas (D-Tat-Clorambucilo, r3-L-TAT-Clorambucilo y r3-L-TATi-Clorambucilo)

Las secuencias de péptidos D-TAT (rrrqrkk; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRR; SEQ ID N°: 20) o r3-L-TATi (rRRQrRKK; SEQ ID N°: 21) se sintetizan manualmente en 0,23 mmol de resina de amida Fmoc-Rink utilizando química Fmoc. Por tanto, cada aminoácido desde Gly C-terminal hasta I-A N-terminal (forma L) se

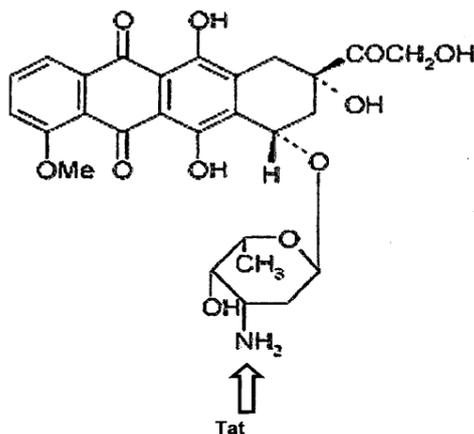
une secuencialmente a la resina con un ciclo de desprotección de F-moc (20% de piperidina en DMF) y acoplamiento de aminoácidos (HBTU/HOBt/DIEA en activación de DMF).

- Después de la desprotección de Fmoc (20% piperidina en DMF) de I-A N-terminal se logra el acoplamiento de clorambucilo utilizando condiciones de acoplamiento de aminoácido estándar (HBTU/HOBt/DIEA en activación de DMF). La molécula conjugada se disocia de la resina con TFA (70 minutos en presencia de un 3% de dH₂O y un 3% de TIS), se filtra a presión atmosférica, se reduce en volumen mediante burbujeo de N₂, se precipita con éter frío y se seca al aire. La molécula conjugada cruda se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa y se caracteriza mediante ESI-MS seguida de liofilización.

8.2 Estudios comparativos

- Aquí se determinan los efectos de un tratamiento con concentraciones crecientes de D-Tat-clorambucilo, r3-L-TAT-clorambucilo o r3-L-TATi-clorambucilo en la supervivencia de MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano) y SiHa (línea celular de carcinoma escamoso de cuello uterino). Los efectos de D-Tat-clorambucilo, r3-L-TAT-clorambucilo o r3-L-TATi-clorambucilo se comparan además con el conjugado L-Tat-clorambucilo y con dos medicamentos anticáncer no conjugados (Clorambucilo y Cisplatino). Las células de cada línea celular (10.000 células por pocillo) se disponen en placas de 96 pocillos (volumen total 200 µl de MEM complementado con un 10% de FBS, un 1% de L-glutamina, un 1% de piruvato de Na, un 1% de aminoácidos no esenciales para células MCF-7 y de MEM/Earle complementado con un 10% de FBS, un 1% de piruvato de Na, un 1% de aminoácidos no esenciales para células SiHa). Se analizan de 6 a 10 concentraciones diferentes de cada sustancia de ensayo. Las células de control no se tratan. Las células se incuban a 37°C durante 24 horas antes del tratamiento con la sustancia de ensayo. Cada experimento se lleva a cabo por triplicado. Después del tratamiento, las células se incuban durante 96 horas a 37°C. Los efectos de las moléculas de ensayo en la supervivencia de estas líneas celulares (actividad citotóxica *in vitro*) se miden mediante el ensayo MTT. Después se añaden a cada pocillo 20 µl de una solución de 5 mg/ml de Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo filtrado por 0,22 µm (MTT, Sigma, N° Ref. 88415) en solución salina tampón de fosfato (PBS, CHUV) y la placa se incuba durante 4 horas a 37°C. El sobrenadante se retira y los cristales de formazano se disuelven con DMSO (200 µl por pocillo). La absorbancia (OD) se mide en un lector de microplacas a 595 nm (Expert Plus Reader, Asys Hitech). La IC₅₀ (concentración del medicamento que inhibe un 50% del crecimiento celular) de las sustancias de ensayo se calcula utilizando *software* Prism.

- 9. Síntesis de las moléculas conjugadas transportador-carga citotóxicas D-Tat-Doxorrubicina, r3-L-TAT-Doxorrubicina y r3-L-TATi-Doxorrubicina**

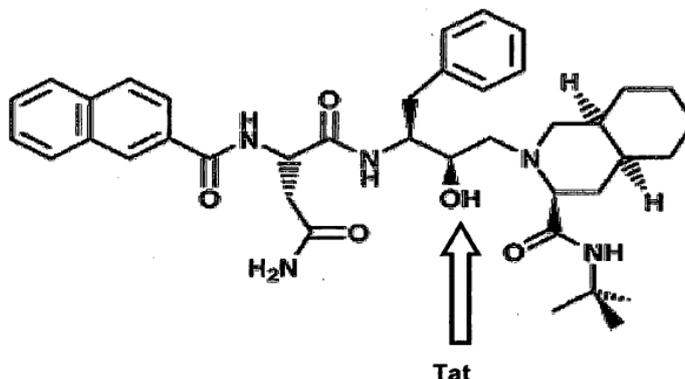


9.1 Síntesis de moléculas conjugadas (D-Tat-doxorrubicina, r3-L-TAT-doxorrubicina y r3-L-TATi-doxorrubicina)

- Las secuencias de péptidos D-TAT (rrrqrkkk; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRRr; SEQ ID N°: 20) o r3-L-TATi (rRRQrRKKr; SEQ ID N°: 21) se sintetizan manualmente en 0,23 mmol de resina de amida Fmoc-Rink utilizando química Fmoc. Por tanto, cada aminoácido desde Gly C-terminal hasta I-E N-terminal (forma L) se une secuencialmente a la resina con un ciclo de desprotección de F-moc (20% de piperidina en DMF) y acoplamiento de aminoácidos (HBTU/HOBt/DIEA en activación de DMF). Después de la desprotección de Fmoc (20% piperidina en DMF) de I-E se lleva a cabo una acetilación (anhídrido acético, DIEA en activación de DMF). Luego se elimina el grupo protector de cadena lateral Odmab utilizando un 2% de monohidrato de hidrazina en DMF. El acoplamiento de clorambucilo formulado como Adriblastin® (Doxorrubicina.HCl 18%, NaCl 82% liofilizado) se logra a través de éster OBt (DIPCDI/HOBt/DIEA en activación de DCM/DMF).

La molécula conjugada se disocia de la resina con TFA (2 horas en presencia de un 1,7% de dH₂O y un 1,7% de TIS), se filtra a presión atmosférica, se reduce en volumen mediante burbujeo de N₂, se precipita con éter frío y se seca al aire. La molécula conjugada cruda se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa y se caracteriza mediante ESI-MS seguida de liofilización.

5 **10.Síntesis de las moléculas conjugadas transportador-carga citotóxicas D-Tat-Saquinavir, r3-L-TAT-Saquinavir y r3-L-TATi-Saquinavir**



10.1 Síntesis de péptidos (D-TAT-D-Cisteína r3-L-TAT-D-Cisteína y r3-L-TATi-D-Cisteína)

10 Las secuencias de péptidos D-TAT (rrrqrkkkr; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRRr; SEQ ID N°: 20) y r3-L-TATi (rRRQrRKKr; SEQ ID N°: 21) se sintetizan manualmente en 0,40 mmol de resina de amida Fmoc-Rink utilizando química Fmoc. Por tanto, cada aminoácido desde D-Arg C-terminal hasta D-Cys N-terminal se une secuencialmente a la resina con un ciclo de desprotección de F-moc (20% de piperidina en DMF) y acoplamiento de aminoácidos (TBTU/HOBt/DIEA en activación de DMF). El péptido se disocia de la resina con TFA, se preincuba sobre hielo (5 horas en presencia de un 2,5% de dH₂O, un 2,5% de EDT y un 1,0% de TIS), se filtra a presión reducida, se precipita con éter frío y se seca al aire. El péptido crudo se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa y se caracteriza mediante ESI-MS.

10.2 Preparación de éster activo de Saquinavir

20 375 µmol Boc-Gly-OH se disuelven en DCM anhidro a temperatura ambiente y a esta solución se le añaden 265 µmol de DMAP, 375 µmol de DIPC1 y 110 µmol de Saquinavir, formulado como Invirase® (lactosa, *excipiens pro compresso obducto*) a 0°C. Después se deja que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente y se agita a lo largo de la noche. El producto se somete a HIS con HCl 0,1N, se seca sobre MgSO₄ y se evapora bajo presión reducida para obtener el producto sólido SQV-Gly(Boc). El grupo protector Boc se elimina por incubación de éster de SQV-Gly(Boc) durante 3 horas en una mezcla de CH₂Cl₂ y TFA (50:50). El producto se recristaliza a partir de éter frío y se seca bajo vacío a lo largo de la noche.

25 Después se disuelven 47 µmol de éster de SQV-Gly en 3 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, y a esta solución se le añaden 94 µmol de SPDP. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 8,0 bajo agitación constante a temperatura ambiente. La mezcla se somete a agitación constante durante 3 horas. El producto crudo SQV-Gly-COCH₂CH₂-SS-piridilo se purifica mediante RP-HPLC semipreparativa y se caracteriza mediante ESI-MS.

30 **10.3 Conjugación del péptido D-TAT (rrrqrkkkr; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRRr; SEQ ID N°: 20) o r3-L-TATi (rRRQrRKKr; SEQ ID N°: 21)-D-Cisteína con Saquinavir**

35 27 µmol de SQV-Gly-COCH₂CH₂-SS-piridilo se disuelven en 0,5 ml de tampón PBS, pH 7,5 a temperatura ambiente, y a esta solución se le añaden 54 µmol de D-TAT (rrrqrkkkr; SEQ ID N°: 251), r3-L-TAT (rKKRrQRRr; SEQ ID N°: 20) o r3-L-TATi (rRRQrRKKr; SEQ ID N°: 21) - D-Cisteína en 0,5 ml de tampón PBS, pH 7,5. La reacción se somete a agitación constante a temperatura ambiente durante 3 horas. Los conjugados crudos D-TAT (rrrqrkkkr; SEQ ID N°: 251) - Saquinavir, r3-L-TAT (rKKRrQRRr; SEQ ID N°: 20) - Saquinavir y r3-L-TATi (rRRQrRKKr; SEQ ID N°: 21) - Saquinavir se purifican mediante RP-HPLC semipreparativa y se caracterizan mediante ESI-MS.

40 **11.Preparación de moléculas conjugadas transportador-carga que comprenden secuencias inhibitoras de JNK como fracciones de carga**

11.1 Identificación de secuencias inhibitoras de JNK

Algunas secuencias de aminoácidos importantes para una interacción eficiente con JNK se identifican mediante alineaciones de secuencias entre JBD conocidos, por ejemplo entre los JBD de IB1, IB2, c-Jun y ATF2, que han definido una secuencia de 8 aminoácidos débilmente conservada. Utilizando esta alineación se han podido identificar secuencias inhibitoras de JNK que conducen a una serie de secuencias inhibitoras de JNK definidas aquí como SEQ ID N°: 137 a 220.

11.2 Preparación de moléculas conjugadas transportador-carga que comprenden secuencias inhibitoras de JNK

Las moléculas conjugadas transportador-carga que comprenden las secuencias inhibitoras de JNK arriba indicadas se sintetizan enlazando de forma covalente el extremo C-terminal de secuencias inhibitoras de JNK tal como se definen aquí con un constructo transportador N-terminal de acuerdo con la fórmula genérica (I) tal como se define más arriba. El constructo transportador de acuerdo con la fórmula genérica (I) tal como se define más arriba se prepara utilizando síntesis de Fmock clásica y se analiza adicionalmente mediante espectrometría de masas. Los componentes se purifican finalmente mediante HPLC. La unión se puede llevar a cabo utilizando un engarce consistente en dos residuos de prolina. Este engarce puede ser utilizado para posibilitar una flexibilidad máxima y prevenir cambios estructurales secundarios no deseados.

11.3 Inhibición de la muerte celular

Aquí se estudian los efectos en actividades biológicas de JNK. El constructo se une de forma N-terminal con Proteína Verde Fluorescente y se evalúa el efecto de este constructo en la apoptosis de células β pancreáticas inducida por IL1. Ya se ha comprobado previamente que este modo de apoptosis se bloquea mediante transfección con JBD₁₋₂₈₀, mientras que inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 no producen ninguna protección.

Células TC-3 productoras de insulina se cultivan en medio RPMI 1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal, 100 μ g/ml de estreptomina, 100 unidades/ml de penicilina y 2 mM glutamina. Las células TC-3 productoras de insulina se someten a transfección con las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención y al medio de cultivo celular se le añade IL-1 (10 ng/ml). La cantidad de células apoptóticas se recuenta 48 horas después de la adición de IL-1 utilizando un microscopio de fluorescencia invertido. Las células apoptóticas se distinguen de las células normales por la "formación de ampollas" característica del citoplasma y se recuentan después de dos días.

12. Importación celular de moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220

Aquí se evalúa la capacidad de las moléculas conjugadas transportador-carga que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 para entrar en las células. Los constructos transportadores de la invención y las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención se marcan mediante la adición N-terminal de un residuo de glicina conjugado con fluoresceína. Estos péptidos marcados (1 μ M) se añaden a cultivos celulares de TC-3, que se mantienen tal como se describe en el Ejemplo 11. En momentos determinados, las células se sacan con PBS y se fijan durante cinco minutos en metanol-acetona (1:1) antes de examinarlas bajo un microscopio de fluorescencia. Como control se utiliza BSA marcado con fluoresceína (1 μ M, 12 mol/mol de BSA).

Además, se determinan señales fluorescentes de estos constructos transportadores y moléculas conjugadas transportador-carga de la invención.

13. Inhibición *in vitro* de fosforilación de c-JUN, ATF2 y Elk1 mediante moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220

Aquí se investigan *in vivo* los efectos de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en la fosforilación mediada por JNK de sus factores de transcripción diana. En primer lugar, se producen JNK1, JNK2 y JNK3 recombinantes y no activadas utilizando un kit de lisado de reticulocito de conejo de TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN (Promega) y se utilizan en ensayos de quinasa en fase sólida con c-Jun, ATF2 y Elk1, solos o fusionados en glutatión-S-transferasa (GST), como sustratos. Luego se realizan estudios de dosis-respuesta, en los que moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 se

mezclan con las JNK1, JNK2 o JNK3 quinasas recombinantes en tampón de reacción (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, fosfato de p-nitrofenilo 10 mM (pNPP), pirofosfato de sodio 5 mM, p-glicerofosfato 10 mM, ditioneitol 1 mM) durante 20 minutos. Después se inician las reacciones de quinasa mediante la adición de

5 MgCl₂ 10 mM y 5 pCi ³³P-dATP y 1 µg de GST-Jun (aa 1-89), GST-AFT2 (aa 1-96) o GST-ELK1 (aa 307-428). Las proteínas de fusión de GST se compran a Stratagene (La Jolla, CA).
También se añaden a la mezcla 10 µl de gránulos de glutatión-agarosa. Después se separan los productos de reacción por SDS-PAGE sobre un gel de poliacrilamida al 10% desnaturalizante. Los geles se secan y a continuación se exponen a películas de rayos X (Kodak), y se determina la inhibición de la fosforilación por c-Jun, ATF2 y Elk1 mediante estas moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden

10 constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220.

14. Inhibición de la muerte de células β pancreáticas inducida por IL-1 mediante moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220

15

Aquí se determinan los efectos de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en la promoción de la apoptosis celular provocada por IL-1. Unos cultivos de células TC-3 se incuban durante 30 minutos con 1 µM de péptidos L-TAT-IB1 (s) de la invención seguidos de 10 ng/ml de IL-1. Veinticuatro horas después se realiza una segunda adición de péptidos (1 µM). Después de dos días de incubación con IL-1 β se cuentan las células apoptóticas utilizando yoduro de propidio (las células teñidas de rojo son células muertas) y tinción nuclear Hoechst 33342 (las células teñidas de azul son células con la membrana plasmática intacta). La adición de los péptidos TAT-IB(s) inhibió la apoptosis inducida por IL-1 de células TC-3 en presencia de IL-1 β durante dos días.

20

La inhibición a largo plazo de la muerte celular inducida por IL-1 se examina tratando células TC-3 tal como se describe más arriba, excepto que la incubación de las células con las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 e IL-1 se mantiene durante 12 días. Cada día se añaden péptidos adicionales (1 µM) y cada 2 días se añade IL-1 adicional (10 ng/ml).

30

15. Inhibición de la muerte de células β pancreáticas inducida por irradiación mediante moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220

35

Las JNK también se activan mediante radiación ionizante. Para determinar si las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 proporcionarían protección contra el daño de JNK inducido por radiación, células "WiDr" se irradian (30 Gy) en presencia o ausencia de D-TAT (SEQ ID N°: 251), L-TAT (SEQ ID N°: 18) y moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 (1 µM añadido 30 minutos antes de la irradiación). Las células de control (CTRL) no se irradian. Las células se analizan 48 horas después por medio de PI y tinción Hoechst 3342, tal como se describe más arriba. N = 3, se indican los EEM.

40

45

16. Radioprotección contra la radiación ionizante mediante moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220

50

Para determinar los efectos radioprotectores de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220, unos ratones C57B1/6 (2 a 3 meses de edad) se irradian con un Phillips RT 250 R-ray en una tasa de dosis de 0,74 Gy/min (17 mA, filtro de Cu de 0,5 mm). Treinta minutos antes de la irradiación, los animales se les inyectan vía i.p. moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo-transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220. En

55

resumen, los ratones se someten a radiación de la siguiente manera: los ratones se introducen en pequeñas cajas de plástico con la cabeza fuera de la caja. Los animales se dispusieron con la espalda bajo el irradiador y el cuello fijado en un pequeño túnel de plástico para mantener la cabeza en una posición correcta. El cuerpo se protege con plomo. Antes de la irradiación, los ratones se mantienen con comida en gránulos estándar para ratones. Sin embargo, después de la irradiación, los ratones se alimentan con una comida semilíquida que se renueva cada día. Después, 2 observadores independientes puntúan la reacción de la mucosa labial de acuerdo con el sistema de puntuación desarrollado por Parkins y col. (Parkins y col., Radiotherapy & Oncology, 1: 165-173, 1983), en el que se califica el estado de eritema, así como la presencia de edema, descamación y exudación. Adicionalmente, los animales se pesaron antes de cada registro del estado de eritema/edema.

17. Supresión de factores de transcripción de JNK por moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220

Aquí se llevan a cabo ensayos de retardo en gel con una sonda con doble marcado AP-1 (5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3' (SEQ ID N°: 262). Extractos nucleares de células HeLa tratados o no durante una hora con 5 ng/ml de TNF- α , tal como se indica. Treinta minutos antes del TNF- α se añaden TAT y moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220.

18. Evaluación de la isquemia cerebral focal contra la neuroprotección, en un modelo OACM permanente - Determinación de la eficacia de la protección en diferentes dosis

A unas ratas de 12 días de edad se les induce una isquemia cerebral focal. Las crías se anestesian en una cámara de inducción con un 2% de isoflurano y la anestesia se mantiene durante la operación utilizando una máscara bajo un 2% de isoflurano. Después se induce una OACM electrocoagulando una rama principal de la arteria cerebral media (ACM). Las ratas se colocan sobre el lado derecho y se realiza una incisión dérmica oblicua entre la oreja y el ojo. Después de extirpar el músculo temporal, el hueso craneal se separa de la sutura frontal hasta un nivel por debajo del arco cigomático. La ACM izquierda, expuesta justo detrás de su aparición sobre la fisura rinal, se electrocoagula permanentemente en la vena cerebral inferior antes de que la ACM se bifurque en las ramas frontal y parietal. Después se cierra la incisión de la piel craneal. Las crías de rata se introducen después en una incubadora mantenida a 37°C hasta que se despiertan, y después son llevadas con su madre.

Seis horas después se inyectan vía intraperitoneal moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220. Veinticuatro horas después de la coagulación, las ratas se anestesian con hidrato de cloral y se les perfunde paraformaldehído al 4% en PBS a través de la aorta ascendente. Después se les extirpa el cerebro y éste se mantiene durante 2 horas en la misma solución de fijación y se dispone en un gradiente de un 30% de sacarosa en PBS durante aproximadamente 15 horas a 4°C. Los cerebros se congelan en isopentano (-40°C) y se guardan a -20°C. Luego se recogieron secciones de criostato coronal de 50 μ m sobre portaobjetos de vidrio. Las secciones se tiñen con violeta de cresilo. Cada décima sección se analiza y el volumen total de la lesión se calcula utilizando el programa Neurolucida.

19. Evaluación de la neuroprotección mediante péptidos quiméricos de la invención después de administración i.v. contra isquemia cerebral focal, en un modelo de OACM temporal

Isquemia temporal en ratones adultos. Utilizando ratones ICR-CD1 macho (6 semanas de edad; 18 - 37 g; Harlan) se provoca una isquemia introduciendo un filamento desde la arteria carótida común en la carótida interna y haciéndolo avanzar dentro del círculo arterial, ocluyendo de este modo la arteria cerebral media. El flujo sanguíneo cerebral regional se mide mediante flujometría Doppler por láser, con una sonda fijada en el cráneo durante toda la isquemia hasta 10 minutos después de la reperfusión. La temperatura rectal se mide y se mantiene a 37°C. Todos los ratones son sacrificados 48 horas después de la reperfusión. Después se trazan secciones de criostato en serie de 20 μ m de espesor utilizando un sistema de microscopio con ordenador equipado con el programa Neurolucida (MicroBrightField) y se calculan (en estudio ciego) los volúmenes del área isquémica y de todo el cerebro con el programa Neuroexplorer. Se determinan los tamaños volumétricos (mm^3) de infarto después de administración de bolo iv de placebo y de moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivadas de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220, 1,3 mg/kg 6 horas después de la reperfusión (pinza de 30 minutos) en un modelo de ratones adultos.

20. Ensayo en cultivos neuronales a través de la medición de la liberación de LDH después de estimulación con NMDA

El efecto neuroprotector de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 se evalúa en cultivos hermanos tratados previamente durante 30 minutos con las concentraciones indicadas de péptidos o MK-801 antes de someterlos a una exposición continua a NMDA 100 μ M. Después de 12 horas de tratamiento con NMDA, en cultivos previamente tratados con 5 μ M de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 se determinan los cambios degenerativos debidos a la exposición a NMDA, el aspecto morfológico, la cantidad y la distribución de las neuronas.

Cultivo neuronal cortical. Pequeñas piezas de córtex se diseccionan de los cerebros de crías de rata de dos días de edad, se incuban con 200 unidades de papaína durante 30 minutos a 34°C y después las neuronas se disponen en placas en densidades de aproximadamente 1×10^6 células/placa, estando las placas previamente revestidas con 100 μ g/ml de poli-D-lisina. El medio de cultivo en placas consistía en B27/Neurobasal (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con glutamina 0,5 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin.

Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH liberada en el medio de baño 12, 24 y 48 horas después de la administración de NMDA se mide utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo Cytotox 96 (Promega, WI).

21. Inhibición de la actividad de JNK endógena en células HepG2 utilizando un método de "todo en un pocillo"

Se siembran células HepG2 a razón de 3.000 células/pocillo el día antes del experimento. Después se añaden concentraciones crecientes de interleucina-1 [IL-1 β] o de factor de necrosis tumoral α [TNF α] (a) para activar JNK durante 30 minutos. Las células se someten a lisis en Hepes 20 mM, 0,5 % Tween pH 7,4 y se procesan para AlphaScreen JNK. (b) Z' para la actividad de JNK inducida mediante 10 ng/ml de IL-1 y se mide en 384 pocillos/placa (n = 96). (c) Inhibición de la actividad de JNK inducida por IL-1 β endógena con inhibidores de JNK químicos [estaurosporina y SP600125]. (d) Efecto de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 e inhibidores peptídicos L-TAT-IB1(s) en la actividad de JNK dependiente de IL-1 α .

Métodos: Ensayo de AlphaScreen quinasa

Principio: AlphaScreen es una tecnología basada en gránulos no radiactivos utilizada para estudiar interacciones biomoleculares en un formato de microplaca. El acrónimo ALPHA representa *Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay* (ensayo homogéneo de proximidad de luminiscencia amplificada). Implica una interacción biológica que pone un gránulo "donante" y un gránulo "aceptor" en estrecha proximidad, después una cascada de reacciones químicas produce una señal amplificada. Después de una excitación con láser a 680 nm, un fotosensibilizador (ftalocianina) en los gránulos "donantes" convierte el oxígeno ambiente en un estado de singulete excitado. Dentro de su vida media de 4 μ s, la molécula de oxígeno singulete se puede difundir hasta aproximadamente 200 nm en solución y, si un gránulo aceptor se encuentra dentro de dicha proximidad, el oxígeno singulete reacciona con un derivado de tioxeno en el gránulo "aceptor", generando una quimioluminiscencia a 370 nm que a su vez activa fluoróforos contenidos en el mismo gránulo "aceptor". A continuación, los fluoróforos excitados emiten luz a 520 - 620 nm. En ausencia de un gránulo aceptor, el oxígeno singulete cae a estado básico y no se produce ninguna señal.

En primer lugar, se diluyen reactivos de quinasa (B-GST-cJun, anticuerpo anti P-cJun y JNK3 activa) en tampón de quinasa (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 100 mM, 0,01% Tween-20) y se añaden al pocillo (15 ml). Las reacciones se incuban después en presencia de 10 mM de ATP durante 1 h a 23°C. La detección se realiza mediante una adición de 10 μ l de mezcla de gránulos (aceptor de Proteína A 20 mg/ml y donante Estreptavidina 20 mg/ml), diluida en tampón de detección (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 20 mM, EDTA 80 mM, 0,3% BSA), seguida de otra hora de incubación a 23°C en oscuridad. Para medir la actividad endógena de JNK se realizan ensayos de quinasa tal como se describe más arriba, excepto que la JNK3 activa se sustituye por lisados celulares y los componentes de quinasa de la reacción se añaden después de la lisis celular. Los anticuerpos B-GST-cjun y P-cJun se utilizan en las mismas concentraciones, mientras que el ATP se utiliza en una concentración 50 mM en lugar de 10 mM. La señal de AlphaScreen se analiza directamente en el aparato Fusion o En Vision.

22. Tratamiento de trauma acústico

Las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 se aplican a la membrana de la ventana redonda de la cóclea de 3 grupos de cobayas (cada grupo con 6 animales) en 2 microlitros de una formulación de gel de ácido hialurónico tamponado al 2,6% (Hylumed, Genzyme Corp.) en una concentración 100 µM 30 minutos antes del trauma acústico (120 dB a 6 kHz durante 30 minutos) o 30 minutos o 4 horas después de éste. Como control se emplean oídos no tratados. Los desplazamientos del umbral auditivo se evalúan a través de mediciones de la respuesta auditiva del tronco encefálico 20 minutos después del trauma acústico (desplazamiento temporal del umbral, *temporary threshold shift* - TTS) y 15 días después del trauma acústico (desplazamiento permanente del umbral, *permanent threshold shift* - PTS). La administración de D-TAT-IB1(s) protegió contra una pérdida permanente de la audición incluso si la aplicación se realizó después de la exposición a un ruido excesivo en comparación con los oídos no tratados.

23. Evaluación de la actividad terapéutica de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de la colitis

- a) Sistema de ensayo
- i) Especie/cepa: ratón / BALB/c.
 - ii) Origen: Harlan Israel, Ltd.
 - iii) Sexo: hembra.
 - iv) N° total de animales: n = 150.
 - v) Edad: adultos jóvenes, 7 semanas de edad al inicio del estudio.
 - vi) Peso corporal: la variación del peso de los animales en el momento del comienzo del tratamiento no sobrepasa el ± 20% del peso medio.
 - vii) Salud de los animales: el estado de salud de los animales utilizados en este estudio se examina a su llegada, únicamente los animales con buena salud se aclimatan a las condiciones de laboratorio (al menos siete días) y se utilizan en el estudio.
 - viii) Aleatorización: los animales se asignan aleatoriamente a grupos experimentales de acuerdo con una tabla de números aleatorios.
 - ix) Terminación: al final del estudio, los animales supervivientes se sacrifican por dislocación cervical.

b) Procedimientos de ensayo

La colitis se induce mediante administración de TNBS disuelto en un 50% de etanol.

Todos los animales son tratados después con dosis de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 que oscilan entre 0,1 y 1000 µg/kg, vía intraperitoneal o subcutánea, en una sola dosis o en dosis diarias repetidas (véase más arriba).

c) Observaciones y exámenes

- i) Signos clínicos
A lo largo de todo el experimento arriba descrito se realizan y registran unos exámenes clínicos meticulosos. Las observaciones incluyen cambios del aspecto externo, por ejemplo de la piel, el pelo, los ojos, las membranas mucosas, la presencia de secreciones y excreciones (por ejemplo diarrea) y la actividad autónoma. También se registran los cambios en el modo de andar, la postura y la respuesta a la manipulación, así como la presencia de un comportamiento extraño, temblores, convulsiones, sueño y coma.
- ii) Pesos corporales
El peso corporal individual de los animales se determina a diario.
- iii) Evaluación clínica de la colitis
El peso corporal, la consistencia de las heces y el sangrado por el recto se registran a diario y sirven como los parámetros para la puntuación de la gravedad de la enfermedad:

Puntuación	Pérdida de peso (%)	Consistencia de las heces	Presencia de sangre por el recto
0	Ninguna	Normal	Negativo
1	1 - 5	Enrojecimiento, hinchamiento del ano	Negativo

Puntuación	Pérdida de peso (%)	Consistencia de las heces	Presencia de sangre por el recto
2	5 - 10	Heces sueltas	Negativo
3	10 - 15	Diarrea	Negativo
4	> 15	Diarrea	Hemorragia
5	Muerte		

iv) Patología macroscópica del colon

El último día del experimento, los animales son sacrificados y se les extirpa el colon para evaluar la patología macroscópica de acuerdo con la siguiente puntuación:

Grado	Signos
0	Ninguna anomalía detectada.
1	Edema y enrojecimiento en un lugar.
2	Edema y enrojecimiento en más de un lugar, o un edema muy masivo y captura de enrojecimiento en más de un 50% del colon.
3	Una úlcera.
4	Más de una úlcera o una úlcera grave muy grande.

5 **24.Determinación de la actividad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de infecciones virales - virus varicela-zóster (VZV)**

10 Determinación de la actividad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en células huésped cultivadas (fibroblastos de prepucio humano - *human foreskin fibroblasts* (HFF)). Los virus son parásitos intracelulares estrictos que requieren un entorno celular funcional para completar su ciclo de vida; las células agonizantes no soportan la replicación viral. Adicionalmente, los inhibidores de las funciones celulares pueden ser tóxicos para las células, que podrían prevenir de forma no específica el crecimiento del virus. Por tanto, las células huésped enfermas o agonizantes podrían presentar títulos virales reducidos de forma no específica. Dado que esto puede falsificar los resultados, primero se realiza un ensayo de citotoxicidad, determinando la tolerancia de las células cultivadas al compuesto de ensayo. A continuación, se lleva a cabo un ensayo de reducción en placa y después se analiza la actividad de las moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 con respecto al virus varicela-zóster (VZV) en células infectadas.

25 A) Determinación de la citotoxicidad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220:

30 Para determinar la toxicidad, unas células cultivadas (fibroblastos de prepucio humano (HFF)) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Después se añade un medio que contiene DMSO (el mismo nivel que 5 µM de moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220) en diversas concentraciones (1, 2 y 5 µM) durante 24 horas. A continuación, se lleva a cabo un ensayo de Rojo Neutro. Los ensayos colorimétricos de Rojo Neutro para ensayos de citotoxicidad (en grupos de 6 réplicas) se utilizan para establecer la dosis máxima para ensayos de eficacia posteriores (tal como se llevan a cabo en Taylor y col., 2004, J. Virology, 78:2853-2862). Las células vivas absorben el Rojo Neutro y, por consiguiente, el nivel de absorbancia es una medida cuantitativa de la viabilidad celular y la cantidad de células. La absorción de Rojo Neutro es directamente proporcional a la cantidad de células y también refleja la endocitosis normal. Por ello se añade un breve impulso de Rojo Neutro al medio a las 0 o 24 horas. Después de la fijación y extracción se añade tinte y la cantidad de tinte de cada muestra se mide en un lector de placas ELISA a 540 nm.

40 B) Ensayo de reducción de placa para evaluar los efectos antivirales de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 contra el virus varicela-zóster (VZV):

Con el fin de determinar si las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 presentan un efecto antiviral dependiente de la dosis, se analiza una serie de concentraciones alrededor de la dosis estándar de 1 μM . En este ensayo de reducción en placa, unos fibroblastos de prepucio humano (HFF) en placas de 24 pocillos se inoculan con HFF infectados con VZV en una proporción de 1:100 (multiplicidad de infección MOI = 0,01) y se adsorben en las células durante 2 horas. El virus en exceso se elimina por HIS y se añade un medio que contiene 0 (solo DMSO), 0,5, 1 o 2 moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220. En este momento se toma una muestra para medir el nivel de infección inicial, conteniendo cada pocillo ~ 150 pfu. Después de 24 horas, los pocillos duplicados se tripsinizan y las suspensiones celulares se titulan después sobre monocapas de células MeWo por triplicado para determinar la cantidad de células infectadas por VZV en cada muestra. Durante el crecimiento sin restricciones, el VZV normalmente aumenta en un factor 10 a lo largo de 1 día porque se propaga por difusión célula-célula. Esto es lo que se observa en cultivos tratados solo con DMSO, que produjeron 1200 ± 430 pfu. Se determinan los datos de citotoxicidad y eficacia. A partir de estos datos se calcula un Índice Selectivo preliminar ($\text{Tox}/\text{EC}_{50}$) de $5,0 \mu\text{M} / 0,3 \mu\text{M}$.

C) Medición de la replicación del virus varicela-zóster (VZV) en fibroblastos de prepucio humano (HFF) con moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220:

Con el fin de determinar la dosis mínima efectiva de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 que previene la replicación del virus varicela-zóster (VZV) en fibroblastos de prepucio humano (HFF), unas monocapas confluentes de HFF se inoculan con cepa VZV-BAC-Luc durante 2 horas, después se tratan durante 24 horas con moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivadas de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en concentraciones de 0,25, 0,5 o 1,0 μM o con un control negativo (DAK, 1,0 μM). El rendimiento viral se mide mediante ensayo de luciferasa. Las muestras son por triplicado y se muestra la luminiscencia media; las barras de error representan la desviación estándar de la media.

25. Determinación de la actividad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

Con el fin de determinar la actividad de los ejemplos de moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), estas moléculas conjugadas transportador-carga de la invención se utilizan en un modelo animal de inflamación pulmonar aguda y fibrosis inducida por bleomicina. El protocolo de la inflamación y fibrosis inducida por bleomicina ya ha sido descrito antes en la literatura. El objetivo del experimento es investigar el efecto de estas moléculas conjugadas transportador-carga de la invención vía subcutánea (s.c.) en el reclutamiento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar (*broncho alveolar lavage* - BAL) y pulmón en inflamación y fibrosis inducida por bleomicina:

- 1 día después de una administración simple de bleomicina (10 mg/kg),
- y el día 10 con el desarrollo de la fibrosis.

1) *Método y enfoque experimental*

Los compuestos de ensayo seleccionados entre las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en dos dosis y control de vehículo se administran vía s.c. con una administración intranasal simple de bleomicina y los ratones son analizados después de 1 y 10 días. Los animales utilizados en el modelo son 10 ratones C57BL/6 (8 semanas de edad) por grupo. Los grupos experimentales incluyen vehículo, 0,001 mg/kg de moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden

5 constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 y 0,1 mg/kg de estas moléculas conjugadas transportador-carga de la invención, y el tratamiento consiste en la administración subcutánea repetida de estas moléculas conjugadas transportador-carga de la invención antes de la administración de bleomicina cada 3 días. La inflamación pulmonar aguda a las 24 horas se controla por lavado BAL, citología, recuentos de células y actividad de mieloperoxidasa pulmonar. El efecto del compuesto se compara con controles de vehículo. La fibrosis pulmonar se evalúa histológicamente utilizando tinción de hematoxilina y eosina el día 10 después de la dosis simple de bleomicina.

1.1) Administración de bleomicina

10 El sulfato de bleomicina en solución salina (10 mg/kg de peso corporal) de Bellon Laboratories (Montrouge, Francia) o solución salina se administran a través de las vías respiratorias mediante instilación nasal en un volumen de 40 µl bajo anestesia ligera con ketamina-xilasina. Los grupos para la administración de bleomicina tanto para la inflamación como para la fibrosis inducidas por bleomicina incluyen: vehículo, 0,001 mg/kg de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden
15 constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 y 0,1 mg/kg de estas moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención. La vía para la inflamación inducida por bleomicina es la vía subcutánea (s.c.), y la administración se realiza como una dosis simple. La vía para la fibrosis inducida por bleomicina es la vía subcutánea (s.c.) y la administración se realiza 3 veces
20 en 10 días.

1.2) Fluido de lavado broncoalveolar (bronchoalveolar lavage fluid - BALF)

Después de realizar una incisión en la tráquea, se inserta una cánula de plástico y los espacios de aire se someten a HIS utilizando 0,3 ml de solución de PBS, calentada a 37°C. Las muestras recogidas se dividen en 2 fracciones: la primera (1 ml correspondiente a los 2 primeros lavados) se utiliza para medición de mediador
25 y la segunda para la determinación celular (4 ml). La primera fracción se centrifuga (600 g durante 10 minutos) y el sobrenadante se fracciona y conserva a -80°C hasta la determinación del mediador. Después, la pella celular se resuspende en 0,4 ml de NaCl estéril, 0,9%, y se reúne con la segunda fracción y se utiliza para recuentos celulares.

1.3) Homogeneización pulmonar

30 Después del BAL se extirpa el pulmón completo y se introduce en un microtubo (Lysing matrix D, Q Bio Gene, Illkrich, Francia) con 1 ml de PBS. Luego se prepara extracto de pulmón total utilizando un sistema Fastprep® (FP120, Q Bio Gene, Illkrich, Francia), el extracto se centrifuga y el sobrenadante se guarda a -80°C antes de la medición de mediador y el ensayo de colágeno con Sircol Collagen Assay (France Biochem Division, Francia).

35 1.4) Recuento y determinación celular

El recuento celular total se determina en fluido BAL utilizando un hemocitómetro Malassez. Los recuentos celulares diferenciales se realizan en preparaciones cytopspin (Cytospin 3, Thermo Shandon) después de tinción con MGG Diff-quick (Dade Behring AG). Los recuentos celulares diferenciales se realizan sobre 200 células utilizando criterios morfológicos estándar.

40 1.5) Medición de TNF

El nivel de TNF en BALF se determina utilizando kits de ensayo ELISA (Mouse DuoSet, R&D system, Minneapolis, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se indican como pg/ml.

1.6) Medición de MPO

45 Los niveles de MPO se miden después de la administración de moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220.

1.7) Histología

50 Después del BAL y perfusión pulmonar, el lóbulo grande se fija en formaldehído tamponado al 4% para análisis microscópico estándar. Unas secciones de 3 µm se tiñen con hematoxilina y eosina (H & E).

26. Determinación de la actividad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

5 Con el fin de determinar la actividad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en la enfermedad de Alzheimer, estos péptidos se evalúan en el modelo de ratón hAPP-transgénico que sobreexpresa APP751 con mutaciones London y Sueca utilizando el ensayo de comportamiento Laberinto Acuático de Morris así como carga de placa de medición de ensayos inmunohistológicos y ensayos ELISA de medición de niveles de β -amiloide₁₋₄₀ y β -amiloide₁₋₄₂ en el cerebro de ratones.

a) MÉTODOS

i) Introducción

15 El estudio está diseñado para evaluar la eficacia de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en marcadores de comportamiento, bioquímicos e histológicos utilizando ratones hAPP Tg hembra de 5 meses (\pm 2 semanas) de edad. Así, los ratones se tratan cada dos o tres semanas hasta los 4 meses y al final del período de tratamiento se evalúa el comportamiento en el Laberinto Acuático de Morris. Después de sacrificar los ratones, se recoge el cerebro, LCR y sangre. Los niveles de A β 40 y A β 42 se determinan en cuatro fracciones de homogeneizado de cerebro diferentes y en LCR de ratones Tg. La carga de placa se cuantifica en el córtex y el hipocampo de 8 animales Tg por grupo de tratamiento.

ii) Animales

25 Unos ratones Tg hembra con antecedentes C57BL/6xDBA y una edad de 5 meses (\pm 2 semanas) se asignan aleatoriamente a los grupos de tratamiento 1 a 3 (n = 12). Los animales se someten a la administración de vehículo o moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en dos concentraciones diferentes comenzando a los 5 meses de edad y continuando hasta 4 meses con administraciones subcutáneas (s.c.) cada dos o tres semanas. Todos los animales utilizados en el presente estudio tenían ojos oscuros y probablemente percibían las marcas de referencia fuera de la piscina del Laberinto Acuático de Morris (*Morris Water Maze* - MWM). No obstante, hay que excluir la posibilidad de que la capacidad visual de un animal sea mala, lo que se controla en el entrenamiento en plataforma visible, la denominada prueba previa, antes del comienzo del tratamiento para todos los animales incluyendo reservas adjuntadas al estudio. Si se confirmara una discapacidad visual de un animal específico, el ratón sería excluido del estudio.

iii) Identificación y alojamiento de los animales

40 Los ratones se identifican individualmente mediante marcas auriculares. Se alojan en jaulas ventiladas individuales (*individual ventilated cages* - IVC) sobre lechos para roedores estándar suministrados por Rettenmaier®. Cada jaula contenía un máximo de cinco ratones. Los ratones se mantienen de acuerdo con los Procedimientos de Operación Estándar JSW (*KSOP GEN011*) redactados sobre la base de normas internacionales. Cada jaula está identificada por una tarjeta de color que indica el número de estudio, el sexo, los números de registro individuales (*individual registration numbers* - IRN) de los animales, la fecha de nacimiento, así como la fecha de selección y la asignación del grupo de tratamiento. La temperatura durante el estudio se mantiene a aproximadamente 24°C y la humedad relativa se mantiene a aproximadamente el 40 - 70%. Los animales se alojan bajo un ciclo de luz constante (12 horas luz/oscuridad). Los animales disponen de agua de grifo normal *ad libitum*.

iv) Tratamiento

50 Cuarenta ratones transgénicos hAPP hembra se tratan con 0,1 mg/kg p.c./cada dos semanas o 10 mg/kg p.c./cada tres semanas de moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en dos dosis diferentes (n = 12/grupo) o se tratan con el vehículo (n = 12) s.c. cada tres semanas a lo largo de cuatro meses.

v) Laberinto Acuático de Morris (MWM)

La tarea en el Laberinto Acuático de Morris (MWM) se lleva a cabo en una piscina circular negra con un diámetro de 100 cm. Ésta se llena con agua de grifo a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y la piscina se divide virtualmente en cuatro sectores. Aproximadamente 0,5 cm por debajo de la superficie del agua se dispone una plataforma transparente (8 cm de diámetro). Durante toda la sesión de prueba, excepto en la prueba previa, la plataforma está situada en el cuadrante sudoeste de la piscina. Un día antes de la sesión de entrenamiento de 4 días de duración, los animales han de realizar una, así llamada, prueba previa (dos pruebas de 60 segundos de duración) para asegurar que las capacidades visuales de cada animal son normales. Únicamente los animales que cumplen esta tarea son encerrados par las pruebas en MWM. En la tarea MWM, cada ratón tenía que realizar tres pruebas en cuatro días consecutivos. Una prueba individual dura un máximo de un minuto. Durante este tiempo, el ratón tiene la oportunidad de encontrar el objetivo diáfano oculto. Si el animal no puede encontrar un "camino" para salir del agua, el investigador lo guía o coloca el ratón sobre la plataforma. Después de cada prueba, los ratones pueden descansar sobre la plataforma a lo largo de 10 - 15 segundos. Durante este tiempo, los ratones tienen la posibilidad de orientarse en el entorno. Las investigaciones tienen lugar bajo condiciones de luz tenue para evitar influencias negativas para el sistema de seguimiento (Kaminski; PCS, Biomedical Research Systems). Sobre las paredes que rodean la piscina están fijados unos carteles con símbolos geométricos llamativos negros (por ejemplo un círculo y un cuadrado) y los ratones pueden utilizar estos símbolos como marcas de referencia para orientarse. Un grupo nadador por prueba consiste en cinco o seis ratones, con lo que se asegura un tiempo entre pruebas de aproximadamente cinco a diez minutos. Para cuantificar la latencia de escape (el tiempo [segundos] que necesita el ratón para encontrar la plataforma oculta y por lo tanto para escapar del agua), el recorrido (la longitud del trayecto [metros] para llegar al objetivo) y el cumplimiento en el cuadrante de objetivo se utiliza un sistema de seguimiento computerizado. El ordenador está conectado con una cámara situada sobre el centro de la piscina. La cámara detecta la señal del diodo emisor de luz (*light emitting diode* - LED) que está sujeto en la cola del ratón con una pequeña horquilla. Una hora después de la última prueba el cuarto día, los ratones han de realizar una, así llamada, prueba de exploración. En este momento, la plataforma se retira de la piscina y, durante la prueba de exploración de un minuto de duración, el experimentador cuenta la cantidad de veces que el ratón cruza sobre la anterior posición del objetivo. Adicionalmente se calcula el cumplimiento en este cuadrante y también en los otros tres cuadrantes. Durante toda esta prueba, un ratón no puede tener ninguna pista de la plataforma, de cualquier naturaleza.

vi) Toma de muestras de tejidos

Al final del período de tratamiento y después de todas las pruebas de comportamiento, todos los ratones restantes ($n = 28$) son sacrificados. Para ello se sedan todos los ratones con anestesia por inhalación estándar (Isoflurano, Baxter), tal como se describe en *SOP MET030*. El líquido cefalorraquídeo (LCR) se obtiene mediante disección roma y exposición del *foramen magnum*. Después de exponerlo se inserta una pipeta Pasteur a una profundidad aproximada de 0,3 - 1 mm en el *foramen magnum*. El LCR se recoge por aspiración y acción capilar hasta que el flujo cesa por completo. Dos partes alícuotas de cada muestra se congelan inmediatamente y se conservan a -80°C hasta que estén listas para su análisis posterior mediante técnica ELISA. Después de la toma de muestras de LCR, cada ratón se coloca en decúbito dorsal, se le abre el tórax y se inserta una aguja de calibre 26 unida a una jeringuilla de 1 cc en la cámara ventricular cardíaca derecha. Después se aplica una ligera aspiración a la aguja y se recoge sangre en EDTA, que se utiliza por consiguiente para obtener plasma. Para obtener plasma, las muestras de sangre de cada ratón se centrifugan a 1.750 rpm (700 g) durante 10 minutos en una centrifuga (GS - 6R Beckman) utilizando un rotor con cubos flotantes (GH - 3.8 Beckman). El plasma se congela y se conserva a -20°C hasta su posterior análisis. Después de la toma de muestras de sangre, los ratones transgénicos son sometidos a perfusión intracardíaca de cloruro de sodio al 0,9%. Los cerebros son extirpados rápidamente y se quita el cerebelo. Los hemisferios derechos de todos los ratones se fijan por inmersión en paraformaldehído al 4%/PBS (pH 7,4) recién producido durante una hora a temperatura ambiente. Después de ello, los cerebros se transfieren a una solución de PBS en sacarosa l 15% durante 24 horas para asegurar la crioprotección. Al día siguiente, los cerebros se congelan en isopentano y se conservan a -80°C hasta que se utilizan para investigaciones histológicas (*SOP MET42*). Los hemisferios izquierdos se pesan y se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -80°C para análisis bioquímico.

vii) Determinación de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$

En cuatro fracciones de homogeneizado de cerebro diferentes de cada ratón Tg así como en muestras de LCR se evalúan los niveles de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ con técnica ELISA. En *The Genetics Company*TM, Suiza (*SOP MET058*), se adquieren kits de ensayo ELISA de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ altamente sensibles. El LCR se prepara tal como se describe más arriba. Para los homogeneizados de cerebro se homogeneizan hemisferios congelados en tampón de solución salina tamponada con TRIS (TBS) (5 ml) que contiene cóctel inhibidor de proteasa. 1,25 ml de este homogeneizado inicial de cerebro en TBS se conserva a -80°C , 1,25 ml se

investigan adicionalmente. El homogeneizado de cerebro restante (2,5 ml) se centrifuga y el sobrenadante resultante (= fracción de TBS) se divide en partes alícuotas y se conserva a -20°C hasta su determinación por ELISA. La pella se suspende en Triton X-100 (2,5 ml), se centrifuga y el sobrenadante (= fracción de Triton X-100) se divide en partes alícuotas y se conserva a -20°C. Estos pasos se repiten con SDS (2,5 ml). La pella procedente de la fracción SDS se suspende en ácido fórmico al 70% (0,5 ml) antes de su centrifugación subsiguiente. El sobrenadante obtenido se neutraliza con TRIS 1 M (9,5 ml) dividido en partes alícuotas y se conserva a -20°C (= fracción AF) Las muestras de las cuatro fracciones de homogenizado de cerebro (TBS, Triton X-100, SDS y AF) se utilizan para la determinación de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ con técnica ELISA. Los kits de ensayo ELISA se compran en *The Genetics Company*TM, Suiza (*SOP Met062*). Se puede suponer que el TBS y el Triton X-100 solubilizan estructuras monoméricas en oligoméricas. Los polímeros como protofibrillas y fibrillas insolubles enagua se podrían disolver en SDS y AF. A este respecto, la investigación de las cuatro fracciones también proporciona una idea del estado de polimerización A.

viii) Evaluación de la morfología cerebral

Los tejidos cerebrales de todos los animales Tg investigados se manipulan exactamente de la misma manera para evitar desviaciones debido a la variación de este procedimiento. A partir de mitades de cerebro de 24 ratones Tg (8 de cada grupo) se cortan sagitalmente 20 criosecciones por capa (en total 5 capas), cada una con un espesor de 10 μ m (Leica CM 3050S) y 5 (una de cada capa) se procesan y evalúan para cuantificar la carga de placa. Las cinco capas sagitales corresponden a las Figuras 104 a 105, 107 a 108, 111 a 112, 115 a 116 y 118 a 119 atlas morfológico "El Cerebro del Ratón" de Paxinos y Franklin (2ª edición). La primera capa está especificada por el requisito de incluir todo el hipocampo con sus regiones CA1, CA2, CA3, GDIb y GDmb. La inmunorreactividad se evalúa cuantitativamente en el hipocampo y en el córtex utilizando el anticuerpo específico de A β humano 6E10 (Signet) y tinción TioflavinaS. Los hemisferios cerebrales restantes o el tejido no utilizado se guardan y conservan a JSW CNS hasta el final del proyecto.

b) EVALUACIÓN

25 i) Comportamiento

En pruebas en el Laberinto Acuático de Morris se miden la longitud del recorrido de nado, las latencias de escape, la velocidad de nado y, en la prueba de exploración, la cantidad de veces que el animal cruza sobre la anterior posición de la plataforma y el tiempo pasado en cada cuadrante de la piscina, para cada animal Tg con un *software* de ordenador especial.

30 ii) Evaluación bioquímica

Las muestras de LCR de todos los ratones Tg y las muestras de las preparaciones cerebrales se analizan con ELISA A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ comercial. Al mismo tiempo se realizan mediciones de patrones adecuados. Las muestras de preparados cerebrales se analizan por duplicado. Debido a la pequeña cantidad de muestra, las muestras de LCR se analizan únicamente en una sola medición.

35 iii) Histología

i1) Medición de deposiciones de amiloides y carga de placa

Para la inmunohistoquímica 6E10 se utiliza el siguiente procedimiento de evaluación:

- aa) Contrastación de la imagen para la visualización de los bordes de la rodaja sin aplicar el contraste a la imagen.
- 40 bb) Dibujo interactivo de los contornos corticales y la medición subsiguiente del área cortical (= área regional).
- cc) Dibujo interactivo del área de interés (ADI) en la que los objetos teñidos se detectan sobre un nivel umbral basado en una intensidad determinada (el mismo para cada imagen) y por encima de un tamaño de 8 μ m².
- 45 dd) Medición el área de cada objeto, la suma del área teñida en el ADI y la cantidad de objetos después de un contraste suave para aumentar la relación señal-ruido (la misma para cada imagen).
- ee) Repetición de aa)-dd) para el hipocampo.
- ff) Cálculo del tamaño de placa medio (= "suma del área de placas / número de placas"), la cantidad relativa de placas y el área de placa (= "número de placas / área regional" y "suma de área de placas / área regional * 100").
- 50 gg) Exportación de datos automática a una hoja de cálculo Excel, incluyendo los parámetros "título de imagen, área regional, número de placas, suma de áreas de placa, cantidad relativa de placas, área relativa de placas y tamaño de placa medio. UN campo para observaciones se utiliza para registrar la calidad de imagen y criterios de exclusión, respectivamente. Los criterios de exclusión son partes que faltan de la rodaja,

muchas arrugas, fallos dominantes o inconsistencias de tinción (por ejemplo debido a protuberancias que pueden impedir la reacción completa del reactivo de bloqueo).

hh) Cierre de la imagen sin salvar (para mantener los datos en bruto).

5 **27. Determinación de la actividad de las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de la diabetes de tipo 2**

10 Este ensayo está diseñado para determinar la actividad de moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, en particular para determinar el efecto del tratamiento crónico con estas moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención en el modelo de ratón db/db de diabetes de tipo 2 mediante la evaluación de los niveles de glucemia en ayunas cada tres días (28 días).

a) Materiales y métodos

15 i) Animales

Un total de veinte (20) ratones db/db macho (8 semanas de edad) se obtienen de Charles River (Alemania). A su llegada, los animales se alojan en grupos (n = 6-7/grupo) y se les ofrece comida regular para roedores (Altromin standard #1324 chow; C. Petersen, Ringsted, Dinamarca) y agua *ad libitum* a no ser que se indique otra cosa.

20 Los ratones se alojan bajo un ciclo de luz/oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 4:00 y apagadas a las 16:00) y en espacios con control de temperatura y humedad.

ii) Grupos y aleatorización

25 El día 4, los ratones se aleatorizan de acuerdo con el nivel de glucemia (en ayunas; glucemia medida en un analizador en línea Biosen S (diagnóstico EKF, Alemania) para participar en uno de los siguientes grupos de tratamiento con medicamento (n = 6):

- 30
- 1) Control de vehículo, S.C. (solución salina fisiológica).
 - 2) Moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220; 1 mg/kg; s.c.
 - 3) Moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220; 10 mg/kg; s.c.

35 Todas las dosis enumeradas se calculan para la base libre. Pureza del medicamento: 95,28%, contenido de péptidos: 78,0%. Todos los compuestos se administran por vía subcutánea (s.c.) en un volumen de 3 ml/kg. Las instrucciones de formulación para el control de vehículo y las moléculas conjugadas de transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 son las siguientes:

40 En primer lugar, las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención que comprenden constructo transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220 se disuelven en el vehículo. Las formulaciones (concentraciones de 0,33 y 3,3 mg/ml, correspondientes a las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente) se preparan de acuerdo con el procedimiento detallado más abajo. Las concentraciones se calculan y expresan teniendo en cuenta la pureza y el contenido de péptido de los ítems de ensayo (el coeficiente multiplicador es 1,346).

45

- Preparación de una solución madre: las moléculas conjugadas transportador-carga de la invención liofilizadas, que comprenden constructos transportadores derivados de TAT de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 8 a 136 y péptidos de carga derivados de JNK1 o IB1 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 137 a 220, se descongelan durante una hora como mínimo y se preparan como una solución madre en el vehículo en una concentración 1 mM. Para cada día de tratamiento se preparan partes alícuotas, que se conservan a aproximadamente -80°C. Cada día de tratamiento se realizan diluciones de esta solución madre hasta las concentraciones requeridas.

- 55
- Conservación de la solución madre: a aproximadamente -80°C.
 - Conservación de las preparaciones diluidas: a temperatura ambiente durante 24 horas como máximo.

- Antes de la solubilización, el polvo se guarda a -20°C. La estabilidad de la solución madre es de 3 meses a aproximadamente -80°C; la estabilidad de las formulaciones diluidas para dosificación a animales es de 24 horas a temperatura ambiente. El material diluido no utilizado se puede conservar hasta 7 días si se mantiene a 4 - 8°C.

5

c) Procedimiento experimental

Ocho días después de la aclimatación, los ratones se tratan diariamente a las 08.00 AM durante 21 días mediante dosificación SC 8 horas antes de apagar las luces a las 04.00 PM de acuerdo con los grupos de esquema.

10

i) Glucemia

La glucemia se mide en animales con 7 horas de ayuno 6 horas después de la dosificación mediante recogida de muestras de sangre de 10 µl de la vena caudal en tubos de hematocrito y análisis subsiguiente en un analizador en línea Biosen S (diagnóstico EKF, Alemania).

15

ii) Jaulas metabólicas

Grupos 1 + 3: Los ratones se introducen en jaulas metabólicas para el registro de la ingestión de comida y agua durante 24 horas y de la producción de orina y heces durante 24 horas. Los ratones se dividen en dos subgrupos de n = 6 - 7 y a continuación se realiza la caracterización metabólica.

20

iii) Panel de adipoquina

Grupos 1 + 3: En tres ocasiones se extrae sangre de la vena caudal utilizando tubos de hematocrito revestidos con EDTA (100 µl). Después de centrifugar la sangre, el plasma se recoge y se conserva a -20°C hasta la medición. Después se determina el siguiente panel de adipoquinas/citoquinas utilizando 7-plex basado en Luminex: leptina, resistina, MCP-1, PAI-1, TNF, insulina e interleucina-6 (IL-6).

25

iv) Terminación

Grupos 1 + 3 (día 111): Los siguientes órganos se extirpan y se pesan: grasa subcutánea inguinal, grasa epididimal, grasa retroperitoneal, cerebro, hígado, riñón, bazo y corazón. Todos los órganos arriba descritos son muestras en 4% PFA para un posible examen histopatológico futuro. Además, se toman muestras de páncreas (*en bloque*) para posibles análisis estereológicos e inmunohistoquímicos, y se toman muestras de los ojos para un posible análisis posterior de retinopatía. Grupo 2 (día 28): No se recoge ningún tejido ni plasma.

30

28. Los derivados de TAT se dirigen a poblaciones de leucocitos humanos

Tras una lisis de hematíes de sangre total se obtuvieron leucocitos humanos primarios (*white blood cells* - WBC). Los WBC se incubaron con 1µM de D-TAT (SEQ ID N°: 251)-FITC o r3- L-TAT (SEQ ID N°: 20)-FITC durante 30 minutos a 37°C, se lavaron en tampón ácido y se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra marcadores superficiales específicos del tipo de célula (CD14 para monocitos, CD15 para polimorfonucleares, CD3 para linfocitos T, CD19 para linfocitos B). Por último, las células que contenían D-TAT-FITC y r3-L-TAT-FITC se analizaron mediante citometría de flujo para medir su contenido de transportador respectivo. Los dos derivados de TAT se dirigen a poblaciones de leucocitos humanos. dTAT y r3LTAT se unen a monocitos, neutrófilos y células T de linfocitos, y menos eficientemente a células B de linfocitos. Existe una diferencia menor entre la especificidad de dTAT y r3-L-TAT, y parece que D-TAT se une más eficientemente a los linfocitos T que r3-L-TAT.

35

40

29. Absorción de constructos transportadores seleccionadas de acuerdo con la presente invención por diferentes tipos de células

45

Las células se dispusieron en placas de 96 pocillos previamente revestidas con poli-D-lisina en una densidad subconfluyente (que puede variar dependiendo del tipo de célula utilizado). Después, diferentes transportadores acoplados con FITC se incubaron con las células durante 15 horas en una concentración 3 µM. Después de este tiempo, las células se mantuvieron sobre hielo durante el resto del procedimiento. Con el fin de retirar los péptidos unidos a la superficie celular, las células se lavaron primero 2 veces con lavado ácido para retirar moléculas unidas a la membrana plasmática. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se sometieron a lisis en un tampón de lisis estándar durante 30 minutos. Después, las placas que contenían lisados celulares se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. El sobrenadante claro se recogió y se transfirió a una placa de 96 pocillos negra para la medición de la fluorescencia FITC intracelular. Se utilizaron las siguientes células:

55

Líneas celulares no leucocitos:

HepG2: células de hepatocarcinoma (humano)

Líneas celulares de leucocitos:

A549: células epiteliales de pulmón (humano)

Raw: macrófagos (ratón)

J77: macrófagos (ratón)

Leucocitos purificados primarios:

MDMO: macrófagos derivados de médula ósea (ratón)

Los resultados se expresan como el porcentaje de absorción de D-TAT (SEQ ID N°: 251) (Figura 17) o r3-L-TAT (SEQ ID N°: 20) (Figura 18). Todos los constructos transportadores presentan absorción en las células respectivas, aunque en tasas diferentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	xi-gen S.A.
5	<120>	Nuevos constructo transportadores y moléculas conjugadas transportador-carga
	<130>	CX01P027WO1
10	<150>	PCT/EP2008/011003
	<151>	2008-12-22
	<160>	262
15	<170>	Patentin versión 3.5
	<210>	1
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
20	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: fórmula genérica (I) DILLXXDm(LLLyDn)a
25	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(1) .. (9)
	<223>	/sustituir="cualquier aminoácido"
30	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(1)..(1)
	<223>	número de repeticiones: 1 o 2
35	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(1)..(1)
	<223>	número de repeticiones: 1 o 2
40	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	/sustituir="D-aminoácido"
45	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(4)..(4)
	<223>	número de repeticiones: 0, 1 o 2
50	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(5)..(5)
	<223>	número de repeticiones: 1 o 2
55	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(5)..(5)
	<223>	/sustituir="D-aminoácido"
60	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(6)..(9)
	<223>	número de repeticiones: 0, 1, 2 o 3
	<220>	

- <221> REPETICIÓN
 <222> (8)..(8)
 <223> número de repeticiones: 0, 1 o 2
- 5 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (9)..(9)
 <223> número de repeticiones: 1 o 2
- 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="D-aminoácido"
- 15 <400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
- <210> 2
 <211> 5
- 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: subfórmula genérica (Ia)
 DILLX₁D₅m
- 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(5)
 <223> /sustituir="cualquier aminoácido"
- 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="el aminoácido es D-aminoácido"
- 35 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (1)..(1)
 <223> el número de repeticiones es 1 o 2
- 40 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (4)..(4)
 <223> el número de repeticiones es 0, 1 o 2
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="el aminoácido es D-aminoácido"
- 50 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (5)..(5)
 <223> el número de repeticiones es 1 o 2
- 55 <400> 2
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
- 60 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT

5	<220> <221> VARIANTE <222> (1)..(13) <223> /sustituir="cualquier aminoácido"
10	<220> <221> VARIANTE <222> (1)..(1) <223> /sustituir="D-aminoácido"
15	<220> <221> REPETICIÓN <222> (1) .. (1) <223> el número de repeticiones es 1 o 2
20	<220> <221> REPETICIÓN <222> (4) .. (4) <223> el número de repeticiones es 0, 1 o 2
25	<220> <221> VARIANTE <222> (5)..(5) <223> /sustituir="D-aminoácido"
30	<220> <221> REPETICIÓN <222> (5) .. (5) <223> el número de repeticiones es 1 o 2
35	<220> <221> REPETICIÓN <222> (8)..(8) <223> el número de repeticiones es 0, 1 o 2
40	<220> <221> VARIANTE <222> (9)..(9) <223> /sustituir="D-aminoácido"
45	<220> <221> REPETICIÓN <222> (9)..(9) <223> el número de repeticiones es 1 o 2
50	<220> <221> REPETICIÓN <222> (12)..(12) <223> el número de repeticiones es 0, 1 o 2
55	<220> <221> VARIANTE <222> (13)..(13) <223> /sustituir="D-aminoácido"
60	<220> <221> REPETICIÓN <222> (13)..(13) <223> el número de repeticiones es 1 o 2
	<400> 4 Xaa Xaa Xaa 1 . 5 10

ES 2 602 785 T3

	<210>	5
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
5	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: subfórmula genéricas (Id) DILLxLxDmLLLxDnLLLxDnLLLxDn
10	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(1)..(17)
	<223>	/sustituir="cualquier aminoácido"
15	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	/sustituir="D-aminoácido"
20	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(1)..(1)
	<223>	el número de repeticiones es 1 o 2
25	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(4)..(4)
	<223>	el número de repeticiones es 0, 1 o 2
30	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(5)..(5)
	<223>	/sustituir="D-aminoácido"
35	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(5)..(5)
	<223>	el número de repeticiones es 1 o 2
40	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(8)..(8)
	<223>	el número de repeticiones es 0, 1 o 2
45	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(9)..(9)
	<223>	/sustituir="D-aminoácido"
50	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(9)..(9)
	<223>	el número de repeticiones es 1 o 2
55	<220>	
	<221>	REPETICIÓN
	<222>	(12)..(12)
	<223>	el número de repeticiones es 0, 1 o 2
60	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(13)..(13)
	<223>	/sustituir="D-aminoácido"

- 5
 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (13)..(13)
 <223> el número de repeticiones es 1 o 2
- 10
 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (16)..(16)
 <223> el número de repeticiones es 0, 1 o 2
- 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> /sustituir="D-aminoácido"
 <400> 5
Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
- Xaa**
- 20
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: subfórmula genérica (Ie)
 DLLLD(LLLD)a
- 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(9)
 <223> /sustituir="cualquier aminoácido"
- 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="D-aminoácido".
- 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="D-aminoácido",
- 45
 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (6)..(9)
 <223> el número de repeticiones es 0, 1, 2 o 3
- 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="D-aminoácido"
- 55
 <400> 6
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
- 55
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: subfórmula genérica (If)
 DLLDLLLLD

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(9)
 <223> /sustituir="cualquier aminoácido"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="D-aminoácido"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="D-aminoácido"

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="D-aminoácido"

25 <400> 7
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
 <210> 8
 <211> 86
 <212> PRT

30 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia VIH-1 TAT (aa 1-86)

35 <400> 8
Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30
His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
65 70 75 80
Pro Thr Gly Pro Lys Glu
85
 <210> 9
 <211> 36
 <212> PRT

40 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <220>
 <221> misc_feature

<223> Descripción de secuencia: secuencia VIH-1 TAT (aa 37-72)

<400> 9
Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg
1 5 10 15

Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser
20 25 30

Leu Ser Lys Gln
35

5
 <210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia VIH-1 TAT (aa 37-58)

15
 <400> 10
Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg
1 5 10 15

Arg Gln Arg Arg Arg Pro
20

20
 <210> 11
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia VIH-1 TAT (aa 38-58) incluyendo un GCC N-terminal adicional

<400> 11
Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg
1 5 10 15

Gln Arg Arg Arg Pro Gly Gly Cys
20

30
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia VIH-1 TAT (aa -47-58) incluyendo un GCC N-terminal adicional

40
 <400> 12
Cys Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro
1 5 10 15

45
 <210> 13
 <211> 15

- 5 <220>
<221> misc_feature
<223> Fórmula general: NH₂-xnb-RKKRRQRRR-Xnb-COOH (véase la Tabla 1)
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> xaa es xnb tal como se define en la fórmula general, representando xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- 15 <220>
<221> REPETICIÓN
<222> (1)..(1)
<223> xaa es xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> xaa es xnb tal como se define en la fórmula general, representando xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- 25 <220>
<221> REPETICIÓN
<222> (11)..(11)
<223> xaa es xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 30 <400> 16
Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa
1 5 10
- 35 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-TAT (s1a) (véase la Tabla 1)
- <400> 17
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10
- 45 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-TAT (s1b) (véase la Tabla 1)
- <400> 18
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 55 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-TAT (s1c) (véase la Tabla 1)

	<400>	19	
			Tyr Asp Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
			1 5 10
5	<210>	20	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico r3-L-TAT (véase Tabla 1)	
	<400>	20	
			Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
			1 5
15	<210>	21	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico r3-L-TATi (véase la Tabla 1)	
	<400>	21	
			Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
			1 5
25	<210>	22	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
30	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico betaA-r3-L-TAT (véase la Tabla 1)	
35	<400>	22	
			Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
			1 5
	<210>	23	
	<211>	9	
40	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico betaA-r3-L-TAT (véase la Tabla 1)	
45	<400>	23	
			Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
			1 5
	<210>	24	
	<211>	9	
50	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico FITC-betaA-r3-L-TAT (véase la Tabla 1)	
55	<400>	24	
			Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
			1 5

ES 2 602 785 T3

	<210>	25
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
5	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico FITC-betaA-r3-L-TAT (véase la Tabla 1)
	<400>	25
10		Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg 1 5
	<210>	26
	<211>	9
	<212>	PRT
15	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-1) (véase la Tabla 1)
20	<400>	26
		Arg Ala Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
	<210>	27
	<211>	9
25	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-2) (véase la Tabla 1)
30	<400>	27
		Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
	<210>	28
35	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
40	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-3) (véase la Tabla 1)
	<400>	28
		Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
45	<210>	29
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
50	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-4) (véase Tabla 1)
	<400>	29
55		Arg Lys Lys Arg Arg Ala Arg Arg Arg 1 5
	<210>	30
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial

ES 2 602 785 T3

- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-5) (véase Tabla 1)
- 5 <400> 30
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg
1 5
- <210> 31
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-6) (véase Tabla 1)
- 15 <400> 31
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
1 5
- <210> 32
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-7) (véase Tabla 1)
- 25 <400> 32
Arg Asp Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- <210> 33
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-8) (véase Tabla 1)
- 35 <400> 33
Arg Lys Asp Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 40 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-9) (ver Tabla 1)
- <400> 34
50 **Arg Lys Lys Asp Arg Gln Arg Arg Arg**
1 5
- <210> 35
<211> 9
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-10) (ver Tabla 1)

- <400> 35
Arg Lys Lys Arg Arg Asp Arg Arg Arg
1 5
- 5 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-11) (ver Tabla 1)
- 10 <400> 36
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Asp Arg Arg
1 5
- 15 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-12) (ver Tabla 1)
- 20 <400> 37
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Asp Arg
1 5
- 25 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-13) (ver Tabla 1)
- <400> 38
Arg Glu Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 35 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-14) (ver Tabla 1)
- <400> 39
Arg Lys Glu Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 45 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-15) (ver Tabla 1)
- 55 <400> 40
Arg Lys Lys Glu Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- <210> 41

- <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-16) (ver Tabla 1)
- <400> 41
Arg Lys Lys Arg Arg Glu Arg Arg Arg
1 5
- 10 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-17) (ver Tabla 1)
- <400> 42
Arg Lys Lys Arg Arg Glu Arg Arg
1 5
- 20 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-18) (ver Tabla 1)
- 30 <400> 43
Arg Lys Lys Arg Arg Glu Arg Arg
1 5
- <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-19) (ver Tabla 1)
- 40 <400> 44
Arg Phe Lys Arg Arg Glu Arg Arg
1 5
- <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-20) (ver Tabla 1)
- 50 <400> 45
Arg Lys Phe Arg Arg Glu Arg Arg
1 5
- 55 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 602 785 T3

	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-21) (ver Tabla 1)
	<400>	46
5		Arg Lys Lys Phe Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
	<210>	47
	<211>	9
	<212>	PRT
10	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-22) (ver Tabla 1)
	<400>	47
15		Arg Lys Lys Arg Arg Phe Arg Arg Arg 1 5
	<210>	48
	<211>	9
20	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-23) (ver Tabla 1)
25	<400>	48
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Phe Arg Arg 1 5
	<210>	49
30	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-24) (ver Tabla 1)
	<400>	49
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Phe Arg 1 5
40	<210>	50
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
45	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-25) (ver Tabla 1)
	<400>	50
		Arg Arg Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
50	<210>	51
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-26) (ver Tabla 1)
	<400>	51

		Arg Lys Arg Arg Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	52
	<211>	9
5	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-27) (ver Tabla 1)
	<400>	52
		Arg Lys Lys Lys Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	53
	<211>	9
15	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
20	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-28) (ver Tabla 1)
	<400>	53
		Arg Lys Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg
		1 5
25	<210>	54
	<211>	9
	<212>	PRT
30	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-29) (ver Tabla 1)
	<400>	54
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Lys Arg Arg
35		1 5
	<210>	55
	<211>	9
40	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-30) (ver Tabla 1)
45	<400>	55
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Lys Arg
		1 5
	<210>	56
	<211>	9
50	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
55	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-31) (ver Tabla 1)
	<400>	56
		Arg His Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	57

ES 2 602 785 T3

- <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-32) (ver Tabla 1)
- <400> 57
Arg Lys His Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 10 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-33) (ver Tabla 1)
- <400> 58
Arg Lys Lys His Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 20 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-34) (ver Tabla 1)
- 30 <400> 59
Arg Lys Lys Arg Arg His Arg Arg Arg
1 5
- <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-35) (ver Tabla 1)
- 40 <400> 60
Arg Lys Lys Arg Arg Gln His Arg Arg
1 5
- <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-36) (ver Tabla 1)
- 50 <400> 61
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg His Arg
1 5
- <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>

	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-37) (ver Tabla 1)
	<400>	62
		Arg Ile Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
5		1 5
	<210>	63
	<211>	9
	<212>	PRT
10	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-38) (ver Tabla 1)
	<400>	63
		Arg Lys Ile Arg Arg Gln Arg Arg Arg
15		1 5
	<210>	64
	<211>	9
	<212>	PRT
20	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-39) (ver Tabla 1)
25	<400>	64
		Arg Lys Lys Ile Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	65
	<211>	9
30	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-40) (ver Tabla 1)
35	<400>	65
		Arg Lys Lys Arg Arg Ile Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	66
40	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
45	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-41) (ver Tabla 1)
	<400>	66
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ile Arg Arg
		1 5
50	<210>	67
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-42) (ver Tabla 1)
	<400>	67

		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ile Arg
		1 5
	<210>	68
	<211>	9
5	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-43) (ver Tabla 1)
	<400>	68
		Arg Leu Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	69
15	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
20	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-44) (ver Tabla 1)
	<400>	69
		Arg Lys Leu Arg Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
25	<210>	70
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
30	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-45) (ver Tabla 1)
	<400>	70
		Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
35	<210>	71
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
40	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-46) (ver Tabla 1)
	<400>	71
45		Arg Lys Lys Arg Arg Leu Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	72
	<211>	9
	<212>	PRT
50	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-47) (ver Tabla 1)
55	<400>	72
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg
		1 5
	<210>	73

- <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-48) (ver Tabla 1)
- <400> 73
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Leu Arg
1 5
- 10 <210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-49) (ver Tabla 1)
- <400> 74
Arg Met Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 20 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-50) (ver Tabla 1)
- 30 <400> 75
Arg Lys Met Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-51) (ver Tabla 1)
- 40 <400> 76
Arg Lys Lys Met Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- <210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-52) (ver Tabla 1)
- 50 <400> 77
Arg Lys Lys Arg Arg Met Arg Arg Arg
1 5
- 55 <210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 602 785 T3

	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-53) (ver Tabla 1)
5	<400>	78 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Met Arg Arg 1 5
	<210>	79
	<211>	9
	<212>	PRT
10	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-54) (ver Tabla 1)
15	<400>	79 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Met Arg 1 5
	<210>	80
	<211>	9
20	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-55) (ver Tabla 1)
25	<400>	80 Arg Asn Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
	<210>	81
30	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
35	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-56) (ver Tabla 1)
	<400>	81 Arg Lys Asn Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
40	<210>	82
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
45	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-57) (ver Tabla 1)
	<400>	82 Arg Lys Lys Asn Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
50	<210>	83
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-58) (ver Tabla 1)
	<400>	83

		Arg Lys Lys Arg Arg Asn Arg Arg Arg 1 5
5	<210>	84
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-59) (ver Tabla 1)
	<400>	84
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Asn Arg Arg 1 5
15	<210>	85
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
20	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-60) (ver Tabla 1)
	<400>	85
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Asn Arg 1 5
25	<210>	86
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
30	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-61) (ver Tabla 1)
	<400>	86
		Arg Gln Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
35	<210>	87
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
40	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-62) (ver Tabla 1)
	<400>	87
		Arg Lys Gln Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
45	<210>	88
	<211>	9
	<212>	PRT
50	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-63) (ver Tabla 1)
55	<400>	88
		Arg Lys Lys Gln Arg Gln Arg Arg Arg 1 5
	<210>	89

- <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-64) (ver Tabla 1)
- <400> 89
Arg Lys Lys Arg Arg Lys Arg Arg Arg
1 5
- 10 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-65) (ver Tabla 1)
- <400> 90
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Gln Arg Arg
1 5
- 20 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-66) (ver Tabla 1)
- 30 <400> 91
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Gln Arg
1 5
- <210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-67) (ver Tabla 1)
- 40 <400> 92
Arg Ser Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-68) (ver Tabla 1)
- 50 <400> 93
Arg Lys Ser Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 55 <210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 602 785 T3

	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-69) (ver Tabla 1)
	<400>	94
5		Arg Lys Lys Ser Arg Gln Arg Arg 1 5
	<210>	95
	<211>	9
	<212>	PRT
10	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-70) (ver Tabla 1)
	<400>	95
15		Arg Lys Lys Arg Arg Ser Arg Arg 1 5
	<210>	96
	<211>	9
20	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-71) (ver Tabla 1)
25	<400>	96
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ser Arg Arg 1 5
	<210>	97
30	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
35	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-72) (ver Tabla 1)
	<400>	97
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ser Arg 1 5
40	<210>	98
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
45	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-73) (ver Tabla 1)
	<400>	98
		Arg Thr Lys Arg Arg Gln Arg Arg 1 5
50	<210>	99
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-74) (ver Tabla 1)
	<400>	99

		Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	100
	<211>	9
5	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-75) (ver Tabla 1)
	<400>	100
		Arg Lys Lys Thr Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	101
	<211>	9
15	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
20	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-76) (ver Tabla 1)
	<400>	101
		Arg Lys Lys Arg Arg Thr Arg Arg Arg
		1 5
	<210>	102
25	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
30	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-77) (ver Tabla 1)
	<400>	102
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Thr Arg Arg
		1 5
35	<210>	103
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
40	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-78) (ver Tabla 1)
	<400>	103
		Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Thr Arg
		1 5
45	<210>	104
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
50	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-79) (ver Tabla 1)
	<400>	104
		Arg Val Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
		1 5
55	<210>	105
	<211>	9
	<212>	PRT

- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 5 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-80) (ver Tabla 1)
- <400> 105
- Arg Lys Val Arg Arg Gln Arg Arg Arg**
1 5
- <210> 106
- 10 <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-81) (ver Tabla 1)
- <400> 106
- Arg Lys Lys Val Arg Gln Arg Arg Arg**
1 5
- <210> 107
- 20 <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-82) (ver Tabla 1)
- <400> 107
- Arg Lys Lys Arg Arg Val Arg Arg Arg**
1 5
- <210> 108
- 30 <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-83) (ver Tabla 1)
- <400> 108
- Arg Lys Lys Arg Arg Gln Val Arg Arg**
1 5
- <210> 109
- 40 <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-84) (ver Tabla 1)
- <400> 109
- Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Val Arg**
1 5
- 50 <210> 110
- <211> 9
- <212> PRT
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-85) (ver Tabla 1)

- <400> 110
Arg Trp Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 5 <210> 111
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 10 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-86) (ver Tabla 1)
- <400> 111
Arg Lys Trp Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 15 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 20 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-87) (ver Tabla 1)
- <400> 112
Arg Lys Lys Trp Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 25 <210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-88) (ver Tabla 1)
- <400> 113
Arg Lys Lys Arg Arg Trp Arg Arg Arg
1 5
- 35 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-89) (ver Tabla 1)
- 45 <400> 114
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Trp Arg Arg
1 5
- <210> 115
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-90) (ver Tabla 1)
- 55 <400> 115
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Trp Arg
1 5

ES 2 602 785 T3

- 5 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-91) (ver Tabla 1)
- 10 <400> 116
Arg Tyr Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 15 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-92) (ver Tabla 1)
- 20 <400> 117
Arg Lys Tyr Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 25 <210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-93) (ver Tabla 1)
- 30 <400> 118
Arg Lys Lys Tyr Arg Gln Arg Arg Arg
1 5
- 35 <210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-94) (ver Tabla 1)
- 40 <400> 119
Arg Lys Lys Arg Arg Tyr Arg Arg Arg
1 5
- 45 <210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-95) (ver Tabla 1)
- <400> 120
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Tyr Arg Arg
1 5
- 55 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico TAT(s2-96) (ver Tabla 1)
- 5 <400> 121
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Tyr Arg
1 5
- <210> 122
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico r3R6 (ver Tabla 1)
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /sustituir="Aminoácido D-enantiomérico arginina"
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /sustituir="Aminoácido D-enantiomérico arginina"
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /sustituir="Aminoácido D-enantiomérico arginina"
- 30 <400> 122
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
- <210> 123
35 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
40 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-R9 (véase la Tabla 1)
- <400> 123
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
- 45 <210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-R8 (véase la Tabla 1)
- <400> 124
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
- 55 <210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>

ES 2 602 785 T3

- <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-R7 (véase la Tabla 1)
- <400> 125
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
- 5 <210> 126
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-R6 (véase la Tabla 1)
- <400> 126
Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
- 15 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-R5 (véase la Tabla 1)
- <400> 127
Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
- 25 <210> 128
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico PTD-4 (véase la Tabla 1)
- 35 <400> 128
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10
- 40 <210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico PTD-4 (variante 1) (ver Tabla 1)
- <400> 129
Trp Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10
- 50 <210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de tráfico PTD-4 (variante 2) (ver Tabla 1)
- <400> 130
Trp Ala Arg Ala Gln Arg Ala Ala Ala Arg Ala
1 5 10

	<210>	131
	<211>	16
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
5	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico L-P1 (Penetratina) (ver Tabla 1)
	<400>	131
10		Arg Gln Val Lys Val Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys 1 5 10 15
	<210>	132
	<211>	16
	<212>	PRT
15	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico D-P1 (Penetratina) (ver Tabla 1)
	<400>	132
20		Lys Lys Trp Lys Met Arg Arg Asn Gln Phe Trp Val Lys Val Gln Arg 1 5 10 15
	<210>	133
	<211>	17
25	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico JNK1, mejor ajuste (ver Tabla 1)
30	<400>	133
		Trp Lys Arg Ala Ala Ala Arg Lys Ala Arg Ala Met Ser Leu Asn Leu 1 5 10 15
	<210>	134
35	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
40	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico JNK1, mejor ajuste (variante 1) (véase la Tabla 1)
	<400>	134
		Trp Lys Arg Ala Ala Ala Arg Ala Ala Arg Ala Met Ser Leu Asn Leu 1 5 10 15
45		Phe
	<210>	135
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
50	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico MDCK secuencia de transcritosa (véase la Tabla 1)
55	<400>	135
		Arg Tyr Arg Gly Asp Leu Gly Arg Arg 1 5

ES 2 602 785 T3

	<210>	136		
	<211>	4		
	<212>	PRT		
5	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Descripción de secuencia: secuencia de tráfico YKGL (véase la Tabla 1)		
10	<400>	136		
		Tyr Lys Gly Leu		
		1		
	<210>	137		
	<211>	2953		
15	<212>	ADN		
	<213>	Rattus norvegicus		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
20	<223>	descripción de secuencia: secuencia de ADNc IB1 de rata		
	<400>	137		
		ccgccccagc tcagtccgaa ccccgcgggc gcgggcggcct cctccacacg cctccacctc		60
		cgcccgccgcc gccgcccgcg ccgcctcccc cgccgctctc cgccccgatg gccaggctga		120
		gccccgggaat ggcggagcga gagagcggcc tgagcggggg tgccgcgtcc ccaccggccg		180
		cttccccatt cctgggactg cacatcgcgt cgcctcccaa tttcaggctc acccatgata		240
		tcagcctgga ggagttagat gatgaagacc tttcggagat cactgatgag tgtggcatca		300
		gcctgcagtg caaagacacc ttgtctctcc ggcccccgcg cgccgggcta ctgtctgcgg		360
		gtagcagcgg tagcgcgggg agccggctgc aggcggagat gctgcagatg gacctgatcg		420
		acgcggcaag tgacactccg ggcgcccagg acgacgaaga ggacgacgac gagctcgcctg		480
		cccaacggcc aggagtgggg ccttccaaag ccgagctctgg ccaggagccg gcgtctcgca		540
		gccagggtca gggccagggc cccggcacag gctgcggaga cacctaccgg cccaagaggc		600
		ctaccacgct caaccttttc ccgcaggtgc cgcggtctca ggacacgctg aataataact		660
		ctttaggcaa aaagcacagt tggcaggacc gtgtgtctcg atcatcctcc cctctgaaga		720
		caggggagca gacgcctcca catgaacata tctgcctgag tgatgagctg ccgccccagg		780
		gcagtcctgt tcccaccag gatcgtggca cttccaccga cagcccttgt cgccgtactg		840
		cagccacca gatggcacct ccaagtggtc cccctgccac tgcacctggt ggccggggcc		900
		actcccatcg agatcggctc atatcagcag atgtgcggct cgaggcgact gaggagatct		960
		acctgacccc agtgcagagg cccccagacc ctgcagaacc cacctccacc ttcttgccac		1020
		ccactgagag ccggatgtct gtcagctcgg atcctgacct tgccgcttac tctgtaactg		1080
25		cagggcgacc gcacccttc atcagtgaag aggatgaggg cttcgaactg ctgtcatccc		1140

ES 2 602 785 T3

```

cagagcaagc tgagccacca ggtggagggt ggcggggaag cctcggggag ccaccaccgc      1200
ctccacgggc ctactgagc tcggacacca gcgcactgtc ctacgactct gtcaagtaca      1260
cactggtggt ggatgagcat gcccagcttg agttggtgag cctgcggcca tgttttggag      1320
attacagtga cgaaagcgac tctgccactg tctatgacaa ctgtgcctct gcctcctcgc      1380
cctacgagtc agccattggt gaggaatatg aggaggcccc tcaaccccgg cctcccacct      1440
gcctgtcaga ggactccaca ccggatgagc ctgacgtcca cttctctaag aagtttctga      1500
atgtcttcat gagtggccgc tctcgttcct ccagtgccga gtcctttggg ctgttctcct      1560
gtgtcatcaa tggggaggag catgagcaaa cccatcgggc tatattcagg tttgtgcctc      1620
ggcatgaaga tgaacttgag ctggaagtgg acgaccctct gctggtggag ctgcaggcag      1680
aagactattg gtatgaggcc tataacatgc gcactggagc ccgtggtgtc tttcctgcct      1740
actatgccat tgaggtcacc aaggagcctg agcacatggc agcccttgcc aaaaacagcg      1800
actggattga ccagttccgg gtgaagtcc tgggctctgt ccaggttctt tatcacaagg      1860
gcaatgatgt cctctgtgct gctatgcaaa agatcgccac caccgcccgg ctcaccgtgc      1920
actttaacct gccctccagc tgtgtccttg aatcagcgt taggggtgtc aagatagggt      1980
tcaaagctga tgaagctcag gaggccaagg gaaataaatg tagccacttt ttccagctaa      2040
aaaacatctc tttctgtggg taccatccaa agaacaacaa gtactttggg tttatcacta      2100
agcacctgc tgaccaccgg tttgcctgcc atgtctttgt gtctgaagat tccaccaaaag      2160
ccctggcaga gtctgtgggg cgtgcatttc agcagttcta caagcaattt gtggaatata      2220
cctgtcctac agaagatatt tacttggagt agcagcaacc cccctctctg cagccccctca      2280
gccccaggcc agtactagga cagctgactg ctgacaggat gttgtactgc cagcagagaa      2340
tgggggagtg agggctgttg gggtcggggg gcagggggtt ggggagaggc agatgcagtt      2400
tattgtaata tatggggtta gattaatcta tggaggacag tacaggctct ctcggggctg      2460
gggaagggca gggctggggg gggggtcagg catctggcca caaaggggtc ccctaggggac      2520
agaggcgctg caccatcctg ggcttgtttc atactagaag ccctggcttt ctggctcttg      2580
ggtcctgcct tgacaaagcc cagccacctg gaagtgtcac cttcccttgt ccacctcacc      2640
cagtgccttg agctcatgct gagcccaagc acctccgaag gactttccag taaggaaatg      2700
gcaacatgtg acagtgagac cctgttctca tctgtggggc tccggcagct ccgacccccca      2760
gcctggccag cacgctgacc ctggcaagct tgtgtgttca aagaaggaga gggccacagc      2820
aagccctgcc tgccagggaa ggttccctct cagctggccc cagccaactg gtcactgtct      2880
tgtcacctgg ctactactat taaagtgcca tttcttgtct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      2940
aaaaaaaaactc gag      2953

```

- 5 <210> 138
- <211> 714
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus
- <220>
- 10 <221> misc_feature
- <223> descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos codificada por secuencia de ADNc IB1 de rata
- <400> 138

ES 2 602 785 T3

Met Ala Arg Leu Ser Pro Gly Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ser Pro Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His
 20 25 30

Ile Ala Ser Pro Pro Asn Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu
 35 40 45

Glu Phe Glu Asp Glu Asp Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile
 50 55 60

Ser Leu Gln Cys Lys Asp Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly
 65 70 75 80

Leu Leu Ser Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala
 85 90 95

Glu Met Leu Gln Met Asp Leu Ile Asp Ala Ala Ser Asp Thr Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Leu Ala Ala Gln Arg Pro
 115 120 125

Gly Val Gly Pro Ser Lys Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg
 130 135 140

Ser Gln Gly Gln Gly Gln Gly Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr
 145 150 155 160

Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
 165 170 175
 Ser Gln Asp Thr Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp
 180 185 190
 Gln Asp Arg Val Ser Arg Ser Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln
 195 200 205
 Thr Pro Pro His Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln
 210 215 220
 Gly Ser Pro Val Pro Thr Gln Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro
 225 230 235 240
 Cys Arg Arg Thr Ala Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Ser Gly Pro Pro
 245 250 255
 Ala Thr Ala Pro Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ser Ile
 260 265 270
 Ser Ala Asp Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro
 275 280 285
 Val Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Glu Pro Thr Ser Thr Phe Leu Pro
 290 295 300
 Pro Thr Glu Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Ser Val Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Asp
 325 330 335
 Glu Gly Phe Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Gln Ala Glu Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Gly Trp Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala
 355 360 365
 Ser Leu Ser Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr
 370 375 380
 Thr Leu Val Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg
 385 390 395 400
 Pro Cys Phe Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr
 405 410 415
 Asp Asn Cys Ala Ser Ala Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu
 420 425 430

Glu Tyr Glu Glu Ala Pro Gln Pro Arg Pro Pro Thr Cys Leu Ser Glu
 435 440 445
 Asp Ser Thr Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu
 450 455 460
 Asn Val Phe Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ala Glu Ser Phe
 465 470 475 480
 Gly Leu Phe Ser Cys Val Ile Asn Gly Glu Glu His Glu Gln Thr His
 485 490
 Arg Ala Ile Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu
 500 505 510
 Glu Val Asp Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp
 515 520 525
 Tyr Glu Ala Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala
 530 535 540
 Tyr Tyr Ala Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu
 545 550 555 560
 Ala Lys Asn Ser Asp Trp Ile Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly
 565 570 575
 Ser Val Gln Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala
 580 585 590
 Met Gln Lys Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro
 595 600 605
 Pro Ser Ser Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly
 610 615 620
 Val Lys Ala Asp Glu Ala Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His
 625 630 635 640
 Phe Phe Gln Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn
 645 650 655
 Asn Lys Tyr Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe
 660 665 670
 Ala Cys His Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu
 675 680 685
 Ser Val Gly Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr
 690 695 700
 Thr Cys Pro Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu
 705 710

<210> 139
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> descripción de secuencia: secuencia de proteínas IB1 humana
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> descripción de secuencia: secuencia de proteínas IB1 humana
 <400> 139
Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ala Ala Ser Pro
1 5 10 15
Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His Ile Ala Ser Pro Pro Asn
20 25 30
Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu Glu Phe Glu Asp Glu Asp
35 40 45
Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile Ser Leu Gln Cys Lys Asp
50 55 60
Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly Leu Leu Ser Ala Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala Glu Met Leu Gln Met Asp Leu
85 90 95
Ile Asp Ala Thr Gly Asp Thr Pro Gly Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp
100 105 110
Asp Asp Glu Glu Arg Ala Ala Arg Arg Pro Gly Ala Gly Pro Pro Lys
115 120 125
 15
Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg Gly Gln Gly Gln Ser Gln
130 135 140
Gly Gln Ser Gln Gly Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg
145 150 155 160
Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
165 170 175
Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp Gln Asp Arg Val
180 185 190

Ser Arg Ser Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln Thr Pro Pro His
 195 200 205
 Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln Ser Gly Pro Ala
 210 215 220
 Pro Thr Thr Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro Cys Arg Arg Ser
 225 230 235 240
 Thr Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Gly Gly Pro Pro Ala Ala Pro Pro
 245 250 255
 Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ile His Tyr Gln Ala Asp
 260 265 270
 Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro Val Gln Arg
 275 280 285
 Pro Pro Asp Ala Ala Glu Pro Thr Ser Ala Phe Leu Pro Pro Thr Glu
 290 295 300
 Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala Tyr Pro Ser
 305 310 315 320
 Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Glu Gly Phe
 325 330 335
 Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Glu Pro Pro Gly Gly Gly Trp
 340 345 350
 Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Ser Leu Ser
 355 360 365
 Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr Thr Leu Val
 370 375 380
 Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg Pro Cys Phe
 385 390 395 400
 Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr Asp Asn Cys
 405 410 415
 Ala Ser Val Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu Glu Tyr Glu
 420 425 430
 Glu Ala Pro Arg Pro Gln Pro Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asp Ser Thr
 435 440 445
 Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu Asn Val Phe
 450 455 460

Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ala Glu Ser Phe Gly Leu Phe
 465 470 475 480

Ser Cys Ile Ile Asn Gly Glu Glu Gln Glu Gln Thr His Arg Ala Ile
 485 490 495

Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu Glu Val Asp
 500 505 510

Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp Tyr Glu Ala
 515 520 525

Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala Tyr Tyr Ala
 530 535 540

Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu Ala Lys Asn
 545 550 555 560

Ser Asp Trp Val Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly Ser Val Gln
 565 570 575

Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala Met Gln Lys
 580 585 590

Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro Pro Ser Ser
 595 600 605

Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly Val Lys Ala
 610 615 620

Asp Asp Ser Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His Phe Phe Gln
 625 630 635 640

Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn Asn Lys Tyr
 645 650 655

Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe Ala Cys His
 660 665 670

Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu Ser Val Gly
 675 680 685

Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr Thr Cys Pro
 690 695 700

Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu
 705 710

- <210> 140
- <211> 2136
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <220>

ES 2 602 785 T3

<221> misc_feature
 <223> descripción de secuencia: secuencia de ácidos nucleicos que codifican proteína IB1 humana

<400> 140
 atggcggagc gagaaagcgg cggcctggga gggggggcgg cgteccccgc cgccgcctcc 60
 ccgttccttg ggctgcacat cgcttcgcct cccaatttca ggctcaccca tgacatcagc 120
 ctggaggagt ttgaggatga agacctctcg gagatcactg atgagtgtgg catcagctta 180
 cagtgcaaag acaccctgtc cttacggccc ccgcgcgccc ggctgctctc tgcgggcggc 240
 ggcggcgcgg ggagccggtt gcaggccgag atgctgcaga tggacctgat cgacgcgacg 300
 ggggacactc ccggggccga ggacgacgag gaggacgacg acgaggagcg cgcgggcccgg 360
 cggccggggag cggggccgcc caaggccgag tccggccagg agccggcgtc ccgcgccag 420
 ggccagagcc aaggccagag ccagggcccg ggcagcgggg acacgtaccg gcccaagcgg 480
 cccaccacgc tcaacctctt tccgcagggt ccgcggtctc aggacacact gaataataat 540
 tctctgggca aaaagcacag ttggcaggat cgggtgtctc gatcatctc acccctgaag 600
 acaggggagc agacaccacc gcatgaacac atctgcctga gcgatgagct gccccccag 660
 agcggccccg cccccaccac agatcgaggc acctccaccg acagcccttg ccgccgcagc 720
 acagccacc agatggcacc tccgggtggt cccctgctg cccgcctgg gggtcggggc 780
 cactcgcac gagaccgaat cactaccag gccgatgtgc gactagaggc cactgaggag 840
 atctacctga cccagtgca gaggccccca gacgctgcag agcccacctc cgccttcctg 900
 ccgcccactg agagccggat gtcagtcagc tccgatccag accctgccc ctaccctcc 960
 acggcagggc ggccgcaccc ctccatcagt gaagaggaag agggcttca ctgcctgtcg 1020
 tccccagagc gggctgagcc cccaggcggg ggggtggcgg ggagcctgg ggagccgccg 1080
 ccacctccac gggcctctct gagctcggac accagcgcct tgcctatga ctctgtcaag 1140
 tacacgctgg tggtagatga gcatgcacag ctggagctgg tgagcctgcg gccgtgttc 1200
 ggagactaca gtgacgagag tgactctgcc accgtctatg acaactgtgc ctccgtctcc 1260
 tcgccctatg agtcggccat cggagaggaa tatgaggagg cccgcggcc ccagccccct 1320
 gcctgcctct ccgaggactc cacgcctgat gaaccgcagc tccatttctc caagaaattc 1380
 5 ctgaacgtct tcatgagtgg ccgctcccgc tcctccagtg ctgagtcctt cgggctgttc 1440
 tcctgcatca tcaacgggga ggagcaggag cagaccacc gggccatatt caggtttgtg 1500
 cctcgacacg aagacgaact tgagctggaa gtggatgacc ctctgctagt ggagctccag 1560
 gctgaagact actggtacga ggcctacaac atgcgactg gtgcccgggg tgtctttcct 1620
 gcctattacg ccatcgaggt caccaaggag cccgagcaca tggcagccct ggccaaaaac 1680
 agtgactggg tggaccagt ccgggtgaag tcctgggct cagtccaggt tcctatcac 1740

	aagggcaatg acgtcctctg tgctgctatg caaaagattg ccaccacccg ccggtcacc	1800
	gtgcacttta acccgccctc cagctgtgtc ctggagatca gcgtgcgggg tgtgaagata	1860
	ggcgtcaagg ccgatgactc ccaggaggcc aaggggaata aatgtagcca cttttccag	1920
	ttaaaaaaca tctcttctg cggatatcat ccaaagaaca acaagtactt tgggttcac	1980
	accaagcacc ccgccacca ccggtttgcc tgccacgtct ttgtgtctga agactccacc	2040
	aaagccctgg cagagtccgt ggggagagca ttccagcagt tctacaagca gtttgggag	2100
	tacacctgcc ccacagaaga tatctacctg gagtag	2136
5	<210> 141 <211> 19 <212> PRT <213> Artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia: péptido L-IB1(s) (véase la Tabla 3)	
	<400> 141 Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg 1 5 10 15	
15	<210> 142 <211> 19 <212> PRT <213> Artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia: Péptido D-IB1(s) (véase la Tabla 3)	
25	<220> <221> MUTÁGENO <222> (1) .. (19) <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos <400> 142	
	Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg 1 5 10 15	
30	<210> 143 <211> 19 <212> PRT <213> Artificial	
35	<220> <223> Descripción de secuencia: Péptido L-IB (genérico) (s) (véase la Tabla 3)	
40	<220> <221> misc_feature <223> Descripción de secuencia: Descripción de secuencia: fórmula general: NH2-Xnb-Xna-RPTTLXLXXXXXXQD-Xnb-COOH (véase la Tabla 1)	
45	<220> <221> VARIANTE <222> (1) .. (1) <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);	
50	<220> <221> REPETICIÓN <222> (1) .. (1) <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb	

- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 5 <223> Xaa es Xna tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo) excepto serina y treonina
- <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (2)..(2)
 10 <223> Xaa es Xna tal como se define en la fórmula general, con n igual a 0 o 1
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 15 <223> Xaa representa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(16)
 20 <223> Xaa representa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
 25
 30
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19) .. (19)
 35 <223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- <400> 143
Xaa Xaa Arg Pro Thr Thr Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
- Gln Asp Xaa**
- 40 <210> 144
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Péptido D-IB (genérico) (s) (véase la Tabla 3)
- <220>
 <221> misc_feature
 50 <223> Descripción de secuencia: fórmula general:
 NH₂-Xnb-DQXXXXXXXXLXLTPR-Xna-Xnb-COOH,
- <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(19)
 55 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1) .. (11)
 60

ES 2 602 785 T3

- <223> Xaa es xnb tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- 5 <220>
<221> REPETICIÓN
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa es xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4) .. (10)
<223> Xaa representa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> xaa representa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- 20 <220>
<221> REPETICIÓN
<222> (18)..(18)
<223> Xaa es Xna tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0 o 1
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa es Xna tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo) excepto serina y treonina
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa es Xna tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo) excepto serina y treonina
- 35 <220>
<221> REPETICIÓN
<222> (19)..(19)
<223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, siendo n igual a 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 o más para Xnb
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (19)..(19)
<223> Xaa es Xnb tal como se define en la fórmula general, representando Xaa un residuo de aminoácido, preferentemente seleccionado entre cualquier residuo de aminoácido (nativo);
- 45 <400> 144
Xaa Asp Gl'n Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Leu Thr Thr Pro
1 5 10 15
- 50 <210> 145
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de secuencia: péptido IB1-largo (véase la Tabla 3)
<400> 145

		Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr
		1 5 10 15
		Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
		20 25
5	<210>	146
	<211>	27
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: Péptido IB2-largo (véase la Tabla 3)
	<400>	146
		Ile Pro Ser Pro Ser Val Glu Glu Pro His Lys His Arg Pro Thr Thr
		1 5 10 15
		Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp Ser
		20 25
15	<210>	147
	<211>	29
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
20	<223>	Descripción de secuencia: Péptido derivado de C-Jun (véase la Tabla 3)
	<400>	147
		Gly Ala Tyr Gly Tyr Ser Asn Pro Lys Ile Leu Lys Gln Ser Met Thr
		1 5 10 15
		Leu Asn Leu Ala Asp Pro Val Gly Asn Leu Lys Pro His
		20 25
25	<210>	148
	<211>	29
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
30	<223>	Descripción de secuencia: Péptido derivado de ATF2 (véase la Tabla 3)
	<400>	148
		Thr Asn Glu Asp His Leu Ala Val His Lys His Lys His Glu Met Thr
		1 5 10 15
		Leu Lys Phe Gly Pro Ala Arg Asn Asp Ser Val Ile Val
		20 25
35	<210>	149
	<211>	23
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
40	<223>	Descripción de secuencia: Péptido L-IB1 (véase la Tabla 3)
	<400>	149

Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
1 5 10 15

Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
20

- 5 <210> 150
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia: Péptido D-IB1 (véase la Tabla 3)
- <220>
- <221> MUTÁGENO
- <222> (1)..(23)
- <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 15 <400> 150

Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Lys Pro Arg Tyr Thr Asp
20

- 20 <210> 151
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Descripción de secuencia: Péptido L-IB (genérico) (véase la Tabla 3)
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1) .. (1)
- 30 <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido,
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (7)..(7)
- 35 <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido,
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (9)..(15)
- 40 <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido,
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (18)..(18)
- 45 <223> Xaa se selecciona entre serina o treonina,
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (19)..(19)
- 50 <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido,
- <400> 151

Xaa Arg Pro Thr Thr Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln
1 5 10 15

Asp Xaa Xaa

- 5 <210> 152
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia: Péptido D-IB (genérico) (véase la Tabla 3)
- <220>
- <221> MUTÁGENO
- <222> (1)..(19)
- <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa se selecciona entre serina o treonina
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (5)..(11)
- <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido
- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (13)..(13)
- <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido
- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (19) .. (19)
- <223> Xaa se selecciona entre cualquier residuo aminoácido

40 <400> 152
Xaa Xaa Asp Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Leu Thr Thr
1 5 10 15

Pro Arg Xaa

- 45 <210> 153
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 50 <220>
- <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s1) (véase la Tabla 3)

<400> 153
Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp
1 5 10

- 55 <210> 154
- <211> 13

ES 2 602 785 T3

- <212> PRT
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> Descripción de secuencia: L-IB1(s2) (véase la Tabla 3)
- <400> 154
Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln
1 5 10
- 10 <210> 155
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 15 <220>
<223> Descripción de secuencia: L-IB1(s3) (véase la Tabla 3)
- <400> 155
Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser
1 5 10
- 20 <210> 156
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de secuencia: L-IB1(s4) (véase la Tabla 3)
- <400> 156
Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
1 5 10
- 30 <210> 157
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> Descripción de secuencia: L-IB1(s5) (véase la Tabla 3)
- <400> 157
Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro
1 5 10
- 40 <210> 158
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de secuencia: L-IB1(s6) (véase la Tabla 3)
- 50 <400> 158
Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val
1 5 10
- 55 <210> 159
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>

ES 2 602 785 T3

<223> Descripción de secuencia: L-IB1(s7) (véase la Tabla 3)

<400> 159
Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
1 5 10

5 <210> 160
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s8) (véase la Tabla 3)

<400> 160
Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp
1 5 10

15 <210> 161
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s9) (véase la Tabla 3)

<400> 161
Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln
1 5 10

25 <210> 162
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s10) (véase la Tabla 3)

<400> 162
Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser
1 5 10

35 <210> 163
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s11) (véase la Tabla 3)

<400> 163
Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
1 5 10

45 <210> 164
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s12) (véase la Tabla 3)

<400> 164

		Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro
		1 5 10
5	<210>	165
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: L-IB1(s13) (véase la Tabla 3)
	<400>	165
		Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val
		1 5 10
15	<210>	166
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: L-IB1(s14) (véase la Tabla 3)
20	<400>	166
		Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
		1 5 10
25	<210>	167
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: L-IB1(s15) (véase la Tabla 3)
	<400>	167
30		Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro
		1 5 10
35	<210>	168
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: L-IB1(s16) (véase la Tabla 3)
	<400>	168
40		Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp
		1 5 10
45	<210>	169
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: L-IB1(s17) (véase la Tabla 3)
	<400>	169
50		Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln
		1 5 10
	<210>	170

ES 2 602 785 T3

- <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s18) (véase la Tabla 3)
- <400> 170
Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser
1 5 10
- 10 <210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 15 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s19) (véase la Tabla 3)
- <400> 171
Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
1 5 10
- <210> 172
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 25 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s20) (véase la Tabla 3)
- <400> 172
Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro
1 5 10
- <210> 173
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 35 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s21) (véase la Tabla 3)
- <400> 173
Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val
1 5 10
- <210> 174
 40 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 45 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s22) (véase la Tabla 3)
- <400> 174
Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
1 5 10
- <210> 175
 50 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 602 785 T3

<220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s23) (véase la Tabla 3)

<400> 175
Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro
1 5 10

5

<210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s24) (véase la Tabla 3)

<400> 176
Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe
1 5 10

15

<210> 177
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s25) (véase la Tabla 3)

<400> 177
Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp
1 5 10

25

<210> 178
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s26) (véase la Tabla 3)

<400> 178
Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln
1 5 10

35

<210> 179
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s27) (véase la Tabla 3)

<400> 179
Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser
1 5 10

45

<210> 180
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s28) (véase la Tabla 3)

<400> 180

Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
1 5 10

5
 <210> 181
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s29) (véase la Tabla 3)

<400> 181
Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro
1 5 10

15
 <210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s30) (véase la Tabla 3)

<400> 182
Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val
1 5 10

25
 <210> 183
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s31) (véase la Tabla 3)

<400> 183
Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
1 5 10

35
 <210> 184
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s32) (véase la Tabla 3)

<400> 184
Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro
1 5 10

45
 <210> 185
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s33) (véase la Tabla 3)

<400> 185
Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe
1 5 10

<210> 186
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: L-IB1(s34) (véase la Tabla 3)
 <400> 186
Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu
 1 5 10
 <210> 187
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s1) (véase la Tabla 3)
 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(13)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 20
 <400> 187
Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro Arg
 1 5 10
 <210> 188
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s2) (véase la Tabla 3)
 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(13)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 35
 <400> 188
Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro
 1 5 10
 <210> 189
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s3) (véase la Tabla 3)
 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(13)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 50
 <400> 189
Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys
 1 5 10
 <210> 190
 <211> 13

- <212> PRT
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s4) (véase la Tabla 3)
- <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(13)
10 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 190
Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg
1 5 10
- 15 <210> 191
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s5) (véase la Tabla 3)
- <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(13)
25 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 191
Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
1 5 10
- 30 <210> 192
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s6) (véase la Tabla 3)
- <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(13)
40 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 192
Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr
1 5 10
- 45 <210> 193
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s7) (véase la Tabla 3)
- <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(13)
55 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 193

		Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr
		1 5 10
	<210>	194
	<211>	12
5	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
10	<223>	Descripción de secuencia: D-IB1(sB) (véase la Tabla 3)
	<220>	
	<221>	MUTÁGENO
	<222>	(1)..(12)
	<223>	todos los aminoácidos son D-aminoácidos
15	<400>	194
		Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro Arg
		1 5 10
	<210>	195
20	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
	<220>	
25	<223>	Descripción de secuencia: D-IB1(s9) (véase la Tabla 3)
	<220>	
	<221>	MUTÁGENO
	<222>	(1)..(12)
30	<223>	todos los aminoácidos son D-aminoácidos
	<400>	195
		Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro
		1 5 10
35	<210>	196
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
40	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: D-IB1(s10) (véase la Tabla 3)
	<220>	
	<221>	MUTÁGENO
45	<222>	(1)..(12)
	<223>	todos los aminoácidos son D-aminoácidos
	<400>	196
		Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys
		1 5 10
50	<210>	197
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
55	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: D-IB1(s11) (véase la Tabla 3)
	<220>	

- <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(12)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 5 <400> 197
Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg
1 5 10
- <210> 198
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s12) (véase la Tabla 3)
- 15 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(12)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 20 <400> 198
Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
1 5 10
- <210> 199
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s13) (véase la Tabla 3)
- 30 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(12)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 35 <400> 199
Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr
1 5 10
- 40 <210> 200
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D=IB1(s14) (véase la Tabla 3)
- 50 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(12)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 55 <400> 200
Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr
1 5 10
- <210> 201
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

- <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s15) (véase la Tabla 3)
- 5 <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(12)
<223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 10 <400> 201
Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu
1 5 10
- <210> 202
<211> 11
15 <212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s16) (véase la Tabla 3)
- 20 <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(11)
<223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 25 <400> 202
Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro Arg
1 5 10
- <210> 203
<211> 11
30 <212> PRT
<213> Artificial
- <220>
35 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s17) (véase la Tabla 3)
- <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(11)
40 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 203
Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro
1 5 10
- 45 <210> 204
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia: D-IB1(s18) (véase la Tabla 3)
- <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(11)
55 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 204
Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys
1 5 10

ES 2 602 785 T3

- 5 <210> 205
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s19) (véase la Tabla 3)
- 10 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 15 <400> 205
Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg
1 5 10
- 20 <210> 206
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s20) (véase la Tabla 3)
- 25 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 30 <400> 206
Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
1 5 10
- 35 <210> 207
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s21) (véase la Tabla 3)
- <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 45 <400> 207
Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr
1 5 10
- 50 <210> 208
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 55 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s22) (véase la Tabla 3)
- <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 60 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos

- <400> 208
Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr
1 5 10
- 5 <210> 209
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s23) (véase la Tabla 3)
- <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 209
Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu
1 5 10
- 20 <210> 210
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s24) (véase la Tabla 3)
- <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(11)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 210
Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn
1 5 10
- 35 <210> 211
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s25) (véase la Tabla 3)
- 45 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(10)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 50 <400> 211
Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu
1 5 10
- 55 <210> 212
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s26) (véase la Tabla 1)

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(10)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 5 <400> 212
Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn
1 5 10

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

<220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s27) (véase la Tabla 3)

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(10)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 20 <400> 213
Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu
1 5 10

<210> 214
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s28) (véase la Tabla 3)

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(10)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 35 <400> 214
Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr
1 5 10

<210> 215
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s29) (véase la Tabla 3)

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(10)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
 50 <400> 215
Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr
1 5 10

<210> 216
 <211> 10
 <212> PRT

- <213> Artificial
- <220>
- 5 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s30) (véase la Tabla 3)
- <220>
- <221> MUTÁGENO
- <222> (1)..(10)
- <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- 10 <400> 216
- Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro**
1 5 10
- <210> 217
- 15 <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s31) (véase la Tabla 3)
- <220>
- <221> MUTÁGENO
- <222> (1)..(10)
- 25 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 217
- Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg**
1 5 10
- 30 <210> 218
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 35 <220>
- <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s32) (véase la Tabla 3)
- <220>
- <221> MUTÁGENO
- <222> (1)..(10)
- 40 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 218
- Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys**
1 5 10
- 45 <210> 219
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 50 <220>
- <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s33) (véase la Tabla 3)
- <220>
- 55 <221> MUTÁGENO
- <222> (1)..(10)
- <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos
- <400> 219

Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro
1 5 10

5 <210> 220
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: D-IB1(s34) (véase la Tabla 3)

15 <220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(10)
 <223> todos los aminoácidos son D-aminoácidos

<400> 220
Leu Asn Leu Thr Thr Pro Arg Lys Pro Arg
1 5 10

20 <210> 221
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos de Bid (humano) (variante de transcripción 1)

<400> 221

Met Cys Ser Gly Ala Gly Val Met Met Ala Arg Trp Ala Ala Arg Gly
 1 5 10 15
 Arg Ala Gly Trp Arg Ser Thr Val Arg Ile Leu Ser Pro Leu Gly His
 20 25 30
 Cys Glu Pro Gly Val Ser Arg Ser Cys Arg Ala Ala Gln Ala Met Asp
 35 40 45
 Cys Glu Val Asn Asn Gly Ser Ser Leu Arg Asp Glu Cys Ile Thr Asn
 50 55 60
 Leu Leu Val Phe Gly Phe Leu Gln Ser Cys Ser Asp Asn Ser Phe Arg
 65 70 75 80
 Arg Glu Leu Asp Ala Leu Gly His Glu Leu Pro Val Leu Ala Pro Gln
 85 90 95
 Trp Glu Gly Tyr Asp Glu Leu Gln Thr Asp Gly Asn Arg Ser Ser His
 100 105 110
 Ser Arg Leu Gly Arg Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Gln Glu Asp Ile
 115 120 125
 Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp
 130 135 140
 Arg Ser Ile Pro Pro Gly Leu Val Asn Gly Leu Ala Leu Gln Leu Arg
 145 150 155 160
 Asn Thr Ser Arg Ser Glu Glu Asp Arg Asn Arg Asp Leu Ala Thr Ala
 165 170 175
 Leu Glu Gln Leu Leu Gln Ala Tyr Pro Arg Asp Met Glu Lys Glu Lys
 180 185 190
 Thr Met Leu Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala Ser His
 195 200 205
 Thr Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn Phe Ile
 210 215 220
 Asn Gln Asn Leu Arg Thr Tyr Val Arg Ser Leu Ala Arg Asn Gly Met
 225 230 235 240

Asp
 <210> 222
 <211> 168
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> Descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos de Bad (humano)

<400> 222

ES 2 602 785 T3

Met Phe Gln Ile Pro Glu Phe Glu Pro Ser Glu Gln Glu Asp Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Ala Glu Arg Gly Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Asp Gly Pro Ser
 20 25 30
 Gly Ser Gly Lys His His Arg Gln Ala Pro Gly Leu Leu Trp Asp Ala
 35 40 45
 Ser His Gln Gln Glu Gln Pro Thr Ser Ser Ser His His Gly Gly Ala
 50 55 60
 Gly Ala Val Glu Ile Arg Ser Arg His Ser Ser Tyr Pro Ala Gly Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Asp Glu Gly Met Gly Glu Glu Pro Ser Pro Phe Arg Gly Arg
 85 90 95
 Ser Arg Ser Ala Pro Pro Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg
 100 105 110
 Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys Gly
 115 120 125
 Leu Pro Arg Pro Lys Ser Ala Gly Thr Ala Thr Gln Met Arg Gln Ser
 130 135 140
 Ser Ser Trp Thr Arg Val Phe Gln Ser Trp Trp Asp Arg Asn Leu Gly
 145 150 155 160
 Arg Gly Ser Ser Ala Pro Ser Gln
 165

5 <210> 223
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos de Noxa1 (humano)

<400> 223

Met Ala Ser Leu Gly Asp Leu Val Arg Ala Trp His Leu Gly Ala Gln
 1 5 10 15
 Ala Val Asp Arg Gly Asp Trp Ala Arg Ala Leu His Leu Phe Ser Gly
 20 25 30
 Val Pro Ala Pro Pro Ala Arg Leu Cys Phe Asn Ala Gly Cys Val His
 35 40 45
 Leu Leu Ala Gly Asp Pro Glu Ala Ala Leu Arg Ala Phe Asp Gln Ala
 50 55 60
 Val Thr Lys Asp Thr Cys Met Ala Val Gly Phe Phe Gln Arg Gly Val
 65 70 75 80
 Ala Asn Phe Gln Leu Ala Arg Phe Gln Glu Ala Leu Ser Asp Phe Trp
 85 90 95
 Leu Ala Leu Glu Gln Leu Arg Gly His Ala Ala Ile Asp Tyr Thr Gln
 100 105 110
 Leu Gly Leu Arg Phe Lys Leu Gln Ala Trp Glu Val Leu His Asn Val
 115 120 125
 Ala Ser Ala Gln Cys Gln Leu Gly Leu Trp Thr Glu Ala Ala Ser Ser
 130 135 140
 Leu Arg Glu Ala Met Ser Lys Trp Pro Glu Gly Ser Leu Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Asp Ser Ala Leu Asp Gln Val Gln Arg Arg Gly Ser Leu Pro Pro Arg
 165 170 175

Gln Val Pro Arg Gly Glu Val Phe Arg Pro His Arg Trp His Leu Lys
 180 185 190
 His Leu Glu Pro Val Asp Phe Leu Gly Lys Ala Lys Val Val Ala Ser
 195 200 205
 Ala Ile Pro Asp Asp Gln Gly Trp Gly Val Arg Pro Gln Gln Pro Gln
 210 215 220
 Gly Pro Gly Ala Asn His Asp Ala Arg Ser Leu Ile Met Asp Ser Pro
 225 230 235 240
 Arg Ala Gly Thr His Gln Gly Pro Leu Asp Ala Glu Thr Glu Val Gly
 245 250 255
 Ala Asp Arg Cys Thr Ser Thr Ala Tyr Gln Glu Gln Arg Pro Gln Val
 260 265 270
 Glu Gln Val Gly Lys Gln Ala Pro Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Met
 275 280 285
 Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro Cys Glu Asp Pro Ala Gly Ala Gly Gly
 290 295 300
 Ala Gly Ala Gly Gly Ser Glu Pro Leu Val Thr Val Thr Val Gln Cys
 305 310 315 320
 Ala Phe Thr Val Ala Leu Arg Ala Arg Arg Gly Ala Asp Leu Ser Ser
 325 330 335
 Leu Arg Ala Leu Leu Gly Gln Ala Leu Pro His Gln Ala Gln Leu Gly
 340 345 350
 Gln Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Gly Glu Asp Gly His Trp Val Pro Ile
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Ser Leu Gln Arg Ala Trp Gln Asp Ala Ala Ala Cys
 370 375 380
 Pro Arg Gly Leu Gln Leu Gln Cys Arg Gly Ala Gly Gly Arg Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Tyr Gln Val Val Ala Gln His Ser Tyr Ser Ala Gln Gly Pro Glu
 405 410 415
 Asp Leu Gly Phe Arg Gln Gly Asp Thr Val Asp Val Leu Cys Glu Glu
 420 425 430
 Pro Asp Val Pro Leu Ala Val Asp Gln Ala Trp Leu Glu Gly His Cys
 435 440 445

Asp Gly Arg Ile Gly Ile Phe Pro Lys Cys Phe Val Val Pro Ala Gly
 450 455 460

Pro Arg Met Ser Gly Ala Pro Gly Arg Leu Pro Arg Ser Gln Gln Gly
 465 470 475 480

Asp Gln Pro

- 5 <210> 224
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10 <223> Descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos de Puma (humana)

<400> 224

Met Ala Arg Ala Arg Gln Glu Gly Ser Ser Pro Glu Pro Val Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Arg Asp Gly Pro Arg Pro Phe Pro Leu Gly Arg Leu Val Pro
 20 25 30

Ser Ala Val Ser Cys Gly Leu Cys Glu Pro Gly Leu Ala Ala Ala Pro
 35 40 45

Ala Ala Pro Thr Leu Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Cys Ala Pro Thr Ala
 50 55 60

Pro Pro Ala Val Thr Ala Ala Leu Gly Gly Ser Arg Trp Pro Gly Gly
 65 70 75 80

Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gly Pro Arg Pro Asp Gly Pro Gln Pro Ser
 85 90 95

Leu Ser Leu Ala Glu Gln His Leu Glu Ser Pro Val Pro Ser Ala Pro
 100 105 110

Gly Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Gln Ala Ala Pro Gly Val Arg Gly
 115 120 125

Glu Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met
 130 135 140

Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg Arg Arg Gln Glu Glu Gln
 145 150 155 160

Gln Arg His Arg Pro Ser Pro Trp Arg Val Leu Tyr Asn Leu Ile Met
 165 170 175

Gly Leu Leu Pro Leu Pro Arg Gly His Arg Ala Pro Glu Met Glu Pro
 180 185 190

- 15 Asn

- <210> 225
- <211> 198

ES 2 602 785 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos de Bim (humano) (variante de transcripción 1)

<400> 225

Met Ala Lys Gln Pro Ser Asp Val Ser Ser Glu Cys Asp Arg Glu Gly
 1 5 10 15

Arg Gln Leu Gln Pro Ala Glu Arg Pro Pro Gln Leu Arg Pro Gly Ala
 20 25 30

Pro Thr Ser Leu Gln Thr Glu Pro Gln Gly Asn Pro Glu Gly Asn His
 35 40 45

Gly Gly Glu Gly Asp Ser Cys Pro His Gly Ser Pro Gln Gly Pro Leu
 50 55 60

Ala Pro Pro Ala Ser Pro Gly Pro Phe Ala Thr Arg Ser Pro Leu Phe
 65 70 75 80

Ile Phe Met Arg Arg Ser Ser Leu Leu Ser Arg Ser Ser Ser Gly Tyr
 85 90 95

Phe Ser Phe Asp Thr Asp Arg Ser Pro Ala Pro Met Ser Cys Asp Lys
 100 105 110

Ser Thr Gln Thr Pro Ser Pro Pro Cys Gln Ala Phe Asn His Tyr Leu
 115 120 125

10 Ser Ala Met Ala Ser Met Arg Gln Ala Glu Pro Ala Asp Met Arg Pro
 130 135 140
 Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn
 145 150 155 160

Ala Tyr Tyr Ala Arg Arg Val Phe Leu Asn Asn Tyr Gln Ala Ala Glu
 165 170 175

Asp His Pro Arg Met Val Ile Leu Arg Leu Leu Arg Tyr Ile Val Arg
 180 185 190

Leu Val Trp Arg Met His
 195

15 <210> 226
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de aminoácidos de Bik (humano)

<400> 226

ES 2 602 785 T3

Met Ser Glu Val Arg Pro Leu Ser Arg Asp Ile Leu Met Glu Thr Leu
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Leu Leu Glu Pro Pro Thr Met Glu Val Leu Gly Met
 20 25 30

Thr Asp Ser Glu Glu Asp Leu Asp Pro Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu
 35 40 45

Glu Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile
 50 55 60

Gly Asp Glu Met Asp Val Ser Leu Arg Ala Pro Arg Leu Ala Gln Leu
 65 70 75 80

Ser Glu Val Ala Met His Ser Leu Gly Leu Ala Phe Ile Tyr Asp Gln
 85 90 95

Thr Glu Asp Ile Arg Asp Val Leu Arg Ser Phe Met Asp Gly Phe Thr
 100 105 110

Thr Leu Lys Glu Asn Ile Met Arg Phe Trp Arg Ser Pro Asn Pro Gly
 115 120 125

Ser Trp Val Ser Cys Glu Gln Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu
 130 135 140

Ala Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Gly Gly Leu His Leu Leu Leu Lys
 145 150 155 160

- <210> 227
- <211> 18
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> misc_feature
- 10 <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bik (Bik BH3)
- <400> 227

Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1 5 10 15

Leu Arg

- 15 <210> 228
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 20 <221> misc_feature
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bad (Bad BH3)
- <400> 228

Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
1 5 10 15

Phe Lys

- 5 <210> 229
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <221> misc_feature
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bid (Bid BH3)
- <400> 229

Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
1 5 10 15

Ile Pro

- 15 <210> 230
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 20 <221> misc_feature
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bmf (Bmf BH3)
- <400> 230

Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
1 5 10 15

His Val

- 30 <210> 231
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 35 <221> misc_feature
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de DPS/Hrk (DP5Hrk BH3)
- <400> 231

Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Ile Gly Asp Glu Leu His Gln Arg
1 5 10 15

Thr Met

- 40 <210> 232
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 45 <221> misc_feature
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bim (Bim BH3)
- 50

<400> 232

Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn Ala Tyr
1 5 10 15

Tyr Ala

5 <210> 233
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Noxa (Noxa BH3)

<400> 233

Glu Cys Ala Thr Gln Leu Arg Arg Phe Gly Asp Lys Leu Asn Phe Arg
1 5 10 15

15 **Gln Lys**

20 <210> 234
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de PUMA (PUMA BH3)

<400> 234

Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
1 5 10 15

Tyr Glu

30 <210> 235
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bax (Bax BH3)

40 <400> 235

Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn
1 5 10 15

Met Glu

45 <210> 236
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

ES 2 602 785 T3

<221> misc_feature
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bak (Bak BH3)

5 <400> 236
Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
1 5 10 15

Tyr Asp

<210> 237
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 15 <223> Descripción de secuencia: secuencia de L-aminoácidos nativa del dominio BH3 de Bok (Bok BH3)

<400> 237
Glu Val Cys Thr Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu Gln Ile
1 5 10 15

Arg Pro

20 <210> 238
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

<400> 238
Lys Asp Glu Leu
 30 **1**

<210> 239
 <211> 4
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

40 <400> 239
Asp Asp Glu Leu
1

<210> 240
 <211> 4
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

50 <400> 240
Asp Glu Glu Leu
1

- 5 <210> 241
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización
- 10 <400> 241
Gln Glu Asp Leu
1
- 15 <210> 242
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de señales o secuencia de localización
- 20 <400> 242
Arg Asp Glu Leu
1
- 25 <210> 243
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización
- 30 <400> 243
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5
- 35 <210> 244
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización
- <400> 244
Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser
1 5
- 45 <210> 245
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización
- <400> 245
Gln Pro Lys Lys Pro
1 5
- 55 <210> 246
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

5 <400> 246
Arg Lys Lys Arg
1

<210> 247
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

15 <400> 247
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln
1 5 10

<210> 248
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

<400> 248
Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg
1 5 10 15

30 <210> 249
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

<400> 249
Met Pro Leu Thr Arg Arg Arg Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Ala Pro
1 5 10 15

40 **Pro Thr Pro**

<210> 250
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia señal o de localización

<400> 250
Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro
1 5 10 15

50 <210> 251
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: D-TAT
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(9)
<223> todos los aminoácidos son aminoácidos D-enantiomérico
- 10 <400> 251
Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5
- <210> 252
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de consenso rxxxrxxxr
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Arg es Arg D-enantiomérica
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Arg es Arg D-enantiomérica
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Arg es Arg D-enantiomérica
- 45 <400> 252
Arg Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Arg
1 5
- <210> 253
<211> 5
<212> PRT
50 <213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia: Motivo de secuencia conservado Trp-Ser-X-rrp-Ser/citoquinas de clase I de la familia de las citoquinas
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 60 <400> 253

		Trp Ser Xaa Trp Ser
		1 5
5	<210>	254
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
10	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: Residuos de cisteína conservados posicionalmente, citoquinas de la clase I de la familia de las citoquinas
	<400>	254
		Cys Cys Cys Cys
		1
15	<210>	255
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
20	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: Secuencia de engarce peptídica
	<400>	255
		Gly Gly Gly Gly Gly
		1 5
25	<210>	256
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
30	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: Secuencia de engarce peptídica
	<400>	256
		Gly Gly Gly Gly
		1
35	<210>	257
	<211>	9
	<212>	PRT
40	<213>	Artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: construcción transportadora todo D (todos los residuos de aminoácido son D-aminoácidos)
45	<400>	257
		Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
		1 5
50	<210>	258
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
55	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia: construcción transportadora D/L (se alternan residuos de D- y L-aminoácido, comenzando por D-aminoácidos)
	<400>	258

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

5 <210> 259
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: construcción transportadora DD/LL
 <400> 259

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

15 <210> 260
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia: construcción transportadora DDD/LLL (r6R3)
 <400> 260

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

25 <210> 261
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia: construcción transportadora DDDD/LLLL
 <400> 261

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

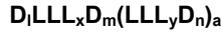
35 <210> 262
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia: sonda con marcador doble AP-1
 <400> 262

45 cgcttgatga gtcagccgga a 21

Reivindicaciones

1. Constructo transportador que comprende o consiste en al menos un patrón D/L de la fórmula genérica (I):



donde D es un D-aminoácido;
 L es un L-aminoácido;
 a es 0 - 3;
 l, m y n son, independientemente entre sí, 1 o 2;
 x e y son, independientemente entre sí, 0, 1 o 2;

5

en particular comprendiendo el constructo transportadoral menos un patrón D/L de acuerdo con una de las siguientes subfórmulas (Ia) a (If):

- (Ia): $D_1 L L L_x D_m$;
 (Ib): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n$;
 (Ic): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n L L L_y D_n$;
 (Id): $D_1 L L L_x D_m L L L_y D_n L L L_y D_n L L L_y D_n$;
 (Ie): $D L L L D (L L L D)_a$, o
 (If): $D L L L D L L L D$, y

10

15

aplicándose el patrón D/L de acuerdo con la fórmula genérica (I) o de acuerdo con cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) a una de las siguientes secuencias:

SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
TAT (1-86)	8	86	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT ACTNCYCKKC CFHCQVCFIT KALGISYGRK KRRQRRRPPQ GSQTHQVSL S KQPTSQSRGD PTGPKE
TAT (37-72)	9	36	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VSL SKQ
TAT (37-58)	10	22	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RP
TAT (38-58)GGC	11	24	FITKALGISY GRKKRRQRRR PGGC
TAT CGG(47-58)	12	15	CGGYGRKKRR QRRRP
TAT (47-58)GGC	13	15	YGRKKRRQRR RPPGGC
TAT (1-72) Mut Cys/Ala 72	14	56	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT AFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VSL SKQ
L-generic-TAT	15	17	XXXXRKKRRQRRRXXXX (NH ₂ - XXXXRKKRRQRRRXXXX -COOH)
L-generic-TAT (s)	16	11	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -COOH

ES 2 602 785 T3

TAT CGG(47-58)	12	15	CGGYGRKKRR QRRRP
TAT (47-58)GGC	13	15	YGRKKRRQRR RPPGGC
TAT (1-72) Mut Cys/Ala 72	14	56	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT AFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VLSKQ
L-generic-TAT	15	17	XXXXRKKRRQRRRXXXX (NH ₂ -XXXXRKKRRQRRRXXXX -COOH)
L-generic-TAT (s)	16	11	NH ₂ -X _n ^p -RKKRRQRRR-X _n ^p -COOH
L-TAT (s1a)	17	10	GRKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (s1b)	18	9	RKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (s1c)	19	11	YDRKKRRQRRR
r ₃ -L-TAT	20	9	rKKRrQRRr
r ₃ -L-TATi	21	9	rRRQrRKKr
βA-r ₃ -L-TAT	22	9	βA-rKKRrQRRr
βA-r ₃ -L-TATi	23	9	βA-rRRQrRKKr
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	24	9	FITC-βA-rKKRrQRRr
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	25	9	FITC-βA-rRRQrRKKr
TAT(s2-1)	26	9	rAKRrQRRr
TAT(s2-2)	27	9	rKARrQRRr
TAT(s2-3)	28	9	rKKArQRRr
TAT(s2-4)	29	9	rKKRrARRr
TAT(s2-5)	30	9	rKKRrQARr
TAT(s2-6)	31	9	rKKRrQARr
TAT(s2-7)	32	9	rDKRrQRRr
TAT(s2-8)	33	9	rKDRrQRRr
TAT(s2-9)	34	9	rKKDrQRRr
TAT(s2-10)	35	9	rKKRrDRRr
TAT(s2-11)	36	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-12)	37	9	rKKRrQRDr

ES 2 602 785 T3

TAT(s2-13)	38	9	rEKRRQRRr
TAT(s2-14)	39	9	rKERrQRRr
TAT(s2-15)	40	9	rKKErQRRr
TAT(s2-16)	41	9	rKKRrERRr
TAT(s2-17)	42	9	rKKRrQERr
TAT(s2-18)	43	9	rKKRrQERr
TAT(s2-19)	44	9	rFKRrQRRr
TAT(s2-20)	45	9	rKFRrQRRr
TAT(s2-21)	46	9	rKKFrQRRr
TAT(s2-22)	47	9	rKKRrFRRr
TAT(s2-23)	48	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-24)	49	9	rKKRrQRFr
TAT(s2-25)	50	9	rRKRrQRRr
TAT(s2-26)	51	9	rRRRrQRRr
TAT(s2-27)	52	9	rKKKQRRr
TAT(s2-28)	53	9	rKKRrRRRr
TAT(s2-29)	54	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-30)	55	9	rKKRrQRKr
TAT(s2-31)	56	9	rHKRrQRRr
TAT(s2-32)	57	9	rKHRrQRRr
TAT(s2-33)	58	9	rKKHrQRRr
TAT(s2-34)	59	9	rKKRrHRRr
TAT(s2-35)	60	9	rKKRrQHRr
TAT(s2-36)	61	9	rKKRrQRHr
TAT(s2-37)	62	9	rIKRrQRRr
TAT(s2-38)	63	9	rKIRrQRRr
TAT(s2-39)	64	9	rKKIrQRRr
TAT(s2-40)	65	9	rKKRrIRRr
TAT(s2-41)	66	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-42)	67	9	rKKRrQRIr
TAT(s2-43)	68	9	rLKRrQRRr
TAT(s2-44)	69	9	rKLRrQRRr
TAT(s2-45)	70	9	rKKLrQRRr
TAT(s2-46)	71	9	rKKRrLRRr
TAT(s2-47)	72	9	rKKRrQLRr
TAT(s2-48)	73	9	rKKRrQLr
TAT(s2-49)	74	9	rMKRrQRRr
TAT(s2-50)	75	9	rKMRrQRRr

ES 2 602 785 T3

TAT(s2-51)	76	9	rKKMrQRRr
TAT(s2-52)	77	9	rKKRrMRRr
TAT(s2-53)	78	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-54)	79	9	rKKRrQRMr
TAT(s2-55)	80	9	rNKRrQRRr
TAT(s2-56)	81	9	rKNRrQRRr
TAT(s2-57)	82	9	rKKNrQRRr
TAT(s2-58)	83	9	rKKRrNRRr
TAT(s2-59)	84	9	rKKRrQNRr
TAT(s2-60)	85	9	rKKRrQRNr
TAT(s2-61)	86	9	rQKRrQRRr
TAT(s2-62)	87	9	rKQRrQRRr
TAT(s2-63)	88	9	rKKQrQRRr
TAT(s2-64)	89	9	rKKRrKRRr
TAT(s2-65)	90	9	rKKRrQQRr
TAT(s2-66)	91	9	rKKRrQRQr
TAT(s2-67)	92	9	rSKRrQRRr
TAT(s2-68)	93	9	rKSRrQRRr
TAT(s2-69)	94	9	rKKSrQRRr
TAT(s2-70)	95	9	rKKRrSRRr
TAT(s2-71)	96	9	rKKRrQSRr
TAT(s2-72)	97	9	rKKRrQRSr
TAT(s2-73)	98	9	rTKRrQRRr
TAT(s2-74)	99	9	rKTRrQRRr
TAT(s2-75)	100	9	rKKTTrQRRr
TAT(s2-76)	101	9	rKKRrTRRr
TAT(s2-77)	102	9	rKKRrQTRr
TAT(s2-78)	103	9	rKKRrQRTr
TAT(s2-79)	104	9	rVKRrQRRr
TAT(s2-80)	105	9	rKVRrQRRr
TAT(s2-81)	106	9	rKKVrQRRr
TAT(s2-82)	107	9	rKKRrVRRr
TAT(s2-83)	108	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-84)	109	9	rKKRrQRVr
TAT(s2-85)	110	9	rWKRrQRRr
TAT(s2-86)	111	9	rKWRrQRRr
TAT(s2-87)	112	9	rKKWrQRRr
TAT(s2-88)	113	9	rKKRrWRRr

TAT(s2-89)	114	9	rKKRrQWRr
TAT(s2-90)	115	9	rKKRrQRWr
TAT(s2-91)	116	9	rYKRrQRRr
TAT(s2-92)	117	9	rKYRrQRRr
TAT(s2-93)	118	9	rKKYrQRRr
TAT(s2-94)	119	9	rKKRrYRRr
TAT(s2-95)	120	9	rKKRrQYRr
TAT(s2-96)	121	9	rKKRrQRYr
r ₃ R ₆	122	9	rRRRrRRRr
L-R ₉	123	9	RRRRRRRRR
L-R ₈	124	8	RRRRRRRRR
L-R ₇	125	7	RRRRRRR
L-R ₆	126	6	RRRRRR
L-R ₅	127	5	RRRRR
PTD-4	128	11	YARAAARQARA
PTD-4 (variant 1)	129	11	WARAAARQARA
PTD-4 (variant 2)	130	11	WARAQAAARA
L-P1 Penetratin	131	16	RQVKVWFQNRMMKWKK
D-P1 Penetratin	132	16	KKWKMRRNQFWVKVQR
JNKI, bestfit	133	17	WKRAAARKARAMSLNLF
JNKI, bestfit (variant 1)	134	17	WKRAAARAARAMSLNLF
MDCK transcytose sequence	135	9	RYRGDLGRR
YKGL	136	4	YKGL
r ₃ (generic)	252	9	rXXXrXXXr

- 5 o una secuencia inversa de éstas, o una variante o fragmento de estas secuencias, conservando una variante o fragmento de estas secuencias la función de posibilitar una translocación a través de membranas biológicas y consistiendo en una secuencia de péptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% en toda la longitud en relación con la secuencia nativa respectiva.
2. Constructo transportador según la reivindicación 1, que comprende o consiste en al menos una secuencia de acuerdo con rXXXrXXXr, donde:
- r representa una arginina D-enantiomérica;
- X es cualquier L-aminoácido;
- 10 y donde cada X se puede seleccionar individual e independientemente de cualquier otro X dentro de rXXXrXXXr, en particular donde al menos 4 de dichos 6 X L-aminoácidos se seleccionan individualmente entre el grupo de L-aminoácidos consistente en K o R.
3. Constructo transportador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende una secuencia seleccionada de entre el siguiente grupo de secuencias:

ES 2 602 785 T3

SECUENCIA/PÉPTIDO	SEQ ID NO	AA	SECUENCIA
r ₃ -L-TAT	20	9	rKKRrQRRr
r ₃ -L-TATi	21	9	rRRQrRKKr
βA-r ₃ -L-TAT	22	9	βA-rKKRrQRRr
βA-r ₃ -L-TATi	23	9	βA-rRRQrRKKr
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	24	9	FITC-βA-rKKRrQRRr
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	25	9	FITC-βA-rRRQrRKKr
TAT(s2-1)	26	9	rAKRrQRRr
TAT(s2-2)	27	9	rKARrQRRr
TAT(s2-3)	28	9	rKKAQRRr
TAT(s2-4)	29	9	rKKRrARRr
TAT(s2-5)	30	9	rKKRrQARr
TAT(s2-6)	31	9	rKKRrQARr
TAT(s2-7)	32	9	rDKRrQRRr
TAT(s2-8)	33	9	rKDRrQRRr
TAT(s2-9)	34	9	rKKDrQRRr
TAT(s2-10)	35	9	rKKRrDRRr
TAT(s2-11)	36	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-12)	37	9	rKKRrQRDr
TAT(s2-13)	38	9	rEKRrQRRr
TAT(s2-14)	39	9	rKERrQRRr
TAT(s2-15)	40	9	rKKErQRRr
TAT(s2-16)	41	9	rKKRrERRr
TAT(s2-17)	42	9	rKKRrQERr
TAT(s2-18)	43	9	rKKRrQERr
TAT(s2-19)	44	9	rFKRrQRRr
TAT(s2-20)	45	9	rKFRrQRRr
TAT(s2-21)	46	9	rKKFrQRRr
TAT(s2-22)	47	9	rKKRrFRRr
TAT(s2-23)	48	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-24)	49	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-25)	50	9	rRKRrQRRr
TAT(s2-26)	51	9	rKRRrQRRr

ES 2 602 785 T3

TAT(s2-27)	52	9	rKKKrQRRr
TAT(s2-28)	53	9	rKKRrRRRr
TAT(s2-29)	54	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-30)	55	9	rKKRrQRKr
TAT(s2-31)	56	9	rHKRrQRRr
TAT(s2-32)	57	9	rKHRrQRRr
TAT(s2-33)	58	9	rKKHrQRRr
TAT(s2-34)	59	9	rKKRrHRRr
TAT(s2-35)	60	9	rKKRrQHRr
TAT(s2-36)	61	9	rKKRrQRHr
TAT(s2-37)	62	9	rIKRrQRRr
TAT(s2-38)	63	9	rKIRrQRRr
TAT(s2-39)	64	9	rKKIrQRRr
TAT(s2-40)	65	9	rKKRrIRRr
TAT(s2-41)	66	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-42)	67	9	rKKRrQRIr
TAT(s2-43)	68	9	rLKRrQRRr
TAT(s2-44)	69	9	rKLRrQRRr
TAT(s2-45)	70	9	rKKLrQRRr
TAT(s2-46)	71	9	rKKRrLRRr
TAT(s2-47)	72	9	rKKRrQLRr
TAT(s2-48)	73	9	rKKRrQRLr
TAT(s2-49)	74	9	rMKRrQRRr
TAT(s2-50)	75	9	rKMRrQRRr
TAT(s2-51)	76	9	rKKMrQRRr
TAT(s2-52)	77	9	rKKRrMRRr
TAT(s2-53)	78	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-54)	79	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-55)	80	9	rNKRrQRRr
TAT(s2-56)	81	9	rKNRrQRRr
TAT(s2-57)	82	9	rKKNrQRRr
TAT(s2-58)	83	9	rKKRrNRRr
TAT(s2-59)	84	9	rKKRrQNRr
TAT(s2-60)	85	9	rKKRrQRNr

ES 2 602 785 T3

TAT(s2-61)	86	9	rQKRrQRRr
TAT(s2-62)	87	9	rKQRrQRRr
TAT(s2-63)	88	9	rKKQrQRRr
TAT(s2-64)	89	9	rKKRrKRRr
TAT(s2-65)	90	9	rKKRrQQRr
TAT(s2-66)	91	9	rKKRrQRQr
TAT(s2-67)	92	9	rSKRrQRRr
TAT(s2-68)	93	9	rKSRrQRRr
TAT(s2-69)	94	9	rKKSrQRRr
TAT(s2-70)	95	9	rKKRrSRRr
TAT(s2-71)	96	9	rKKRrQSRr
TAT(s2-72)	97	9	rKKRrQRSr
TAT(s2-73)	98	9	rTKRrQRRr
TAT(s2-74)	99	9	rKTRrQRRr
TAT(s2-75)	100	9	rKKTTrQRRr
TAT(s2-76)	101	9	rKKRrTRRr
TAT(s2-77)	102	9	rKKRrQTRr
TAT(s2-78)	103	9	rKKRrQRTTr
TAT(s2-79)	104	9	rVKRrQRRr
TAT(s2-80)	105	9	rKVRrQRRr
TAT(s2-81)	106	9	rKKVrQRRr
TAT(s2-82)	107	9	rKKRrVRRr
TAT(s2-83)	108	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-84)	109	9	rKKRrQRVr
TAT(s2-85)	110	9	rWKRrQRRr
TAT(s2-86)	111	9	rKWRrQRRr
TAT(s2-87)	112	9	rKKWrQRRr
TAT(s2-88)	113	9	rKKRrWRRr
TAT(s2-89)	114	9	rKKRrQWRr
TAT(s2-90)	115	9	rKKRrQRWr
TAT(s2-91)	116	9	rYKRrQRRr
TAT(s2-92)	117	9	rKYRrQRRr
TAT(s2-93)	118	9	rKKYrQRRr

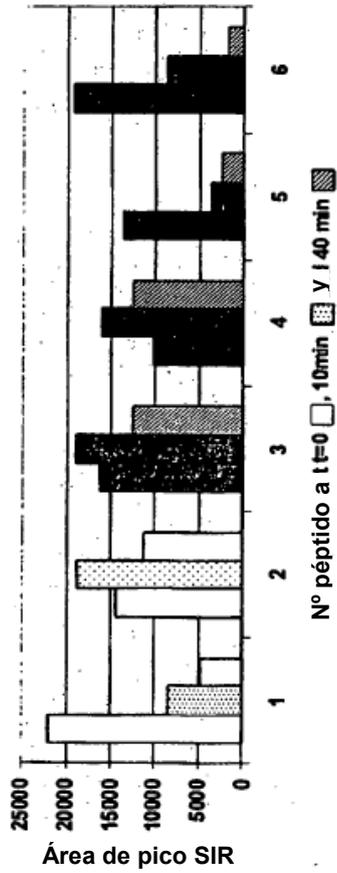
TAT(s2-94)	119	9	rKKRrYRRr
TAT(s2-95)	120	9	rKKRrQYRr
TAT(s2-96)	121	9	rKKRrQRYr
r ₃ R ₆	122	9	rRRRrRRRr

- o una variante o fragmento de estas secuencias, conservando una variante o fragmento de estas secuencias la función de posibilitar una translocación a través de membranas biológicas y consistiendo en una secuencia de péptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% en toda la longitud en relación con la secuencia de tráfico nativa respectiva.
- 5
4. Constructo transportador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la subfórmula (If) DLLLLLLD, aplicándose la subfórmula (If) a una secuencia de tráfico derivada de proteína VIH-1 TAT que tiene una tirosina (Y) en la posición 2 de la secuencia derivada de TAT, seleccionándose la secuencia preferentemente entre la secuencia rYKRrQRRr (TAT(s2-91)).
- 10
5. Constructo transportador según la reivindicación 3, que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en rKKRrQRRr (r₃-L-TAT) y rRRQrRKKr (r₃-L-TATi).
6. Constructo transportador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la fórmula genérica (I) o en cualquiera de las subfórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) se aplica a una variante o fragmento de cualquiera de las secuencias de tráfico enumeradas en las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% u 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% a lo largo de toda la longitud de cualquiera de las secuencias de tráfico enumeradas en las reivindicaciones 1 a 5.
- 15
7. Molécula conjugada transportador-carga, que comprende
- 20
- a) un componente (A), siendo el componente (A) el constructo transportador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
- b) un componente (B) que comprende una molécula efectora, seleccionándose la molécula efectora en particular entre proteínas y péptidos terapéuticamente activos, inhibidores de la proteína quinasa, inhibidores de la proteína quinasa c-Jun quinasa amino terminal, antígenos, anticuerpos, factores apoptóticos, proteasas implicadas en estados patológicos, preferentemente inhibidores de proteasas peptídicas, dominios BH3, proteínas solo BH3, ácidos nucleicos que codifican estas proteínas ARNip, ARN antisentido, agentes citotóxicos y pequeños compuestos orgánicos que incluyen inhibidores de proteasas.
- 25
8. Molécula conjugada transportador-carga según la reivindicación 7, que adicionalmente comprende al menos un componente adicional (C), (D) y/o (E), diferente del componente (B), seleccionándose el o los componentes adicionales opcionales (C), (D) y/o (E), independientemente entre sí, entre diferentes moléculas efectoras tal como se define para el componente (B).
- 30
9. Molécula conjugada transportador-carga según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en la que:
- 35
- a) los componentes (A) y (B), y los componentes opcionales (C), (D) y/o (E), están unidos entre sí de forma covalente, y/o
- b) el o los componentes adicionales (C), (D) y/o (E) se seleccionan entre una secuencia señal o de localización, que dirige la molécula conjugada transportador-carga a un emplazamiento diana intracelular particular o a un tipo de célula particular, y/o
- 40
- c) el componente (B) y/o el o los componentes adicionales (C), (D) y/o (E) consisten en una secuencia de proteínas o péptidos y están compuestos por L-aminoácidos, D-aminoácidos o una mezcla de ambos, y/o
- d) el componente (A) está situado en el extremo C-terminal de la molécula conjugada transportador-carga, con la condición de que el componente (B) sea una secuencia de proteínas o péptidos.
- 45
10. Molécula conjugada transportador-carga según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para su uso como medicamento.

11. Composición farmacéutica que comprende una molécula conjugada transportador-carga según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y opcionalmente un soporte y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 12. Utilización de un constructo transportador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de una molécula conjugada transportador-carga, en particular siendo la molécula conjugada transportador-carga tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 10 13. Utilización de un constructo transportador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de una molécula conjugada transportador-carga tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para la preparación de un medicamento para el transporte de una molécula de carga al interior de células o tejidos de un paciente a tratar, en particular siendo la carga tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
14. Utilización según la reivindicación 13 para el transporte de una molécula de carga al interior de leucocitos y/o células neuronales, en particular de un paciente a tratar.
- 15 15. Utilización de una molécula conjugada transportador-carga según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para la preparación de un medicamento para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora de enfermedades cancerosas o tumorales, incluyendo enfermedades causadas por apoptosis defectuosa, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades (infecciosas) virales, enfermedades fuertemente relacionadas con las señales de JNK, enfermedades o afecciones autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neuronales o neurodegenerativas, enfermedades hepáticas, enfermedades de la columna, enfermedades del útero, trastornos depresivos mayores, enfermedades digestivas inflamatorias crónicas o no crónicas, pérdida de audición, enfermedades del oído interno, o para su uso en trasplantes de tejidos.
- 20

Patrón mínimo que confiere sensibilidad a las proteasas (Prot K)

Ensayos de Degradación Cuantitativa de Péptidos Poli-Arg



Nº ID	Patrón	Secuencia (extr. N a extr. C)	Sensibilidad de proteasa
1-	all L-	RRRRRRRRR (reference sequence)	+
2-	all D-	rrrrrrrrr	-
3-	D/L-	rRrRrRrRr	-
4-	DD/LL-	rrRRrrRRr	-
5-	DDD/LLL-	rrrRRrrrr	+
6-	DDDD/LLLL-	rrrRRRRrr	+

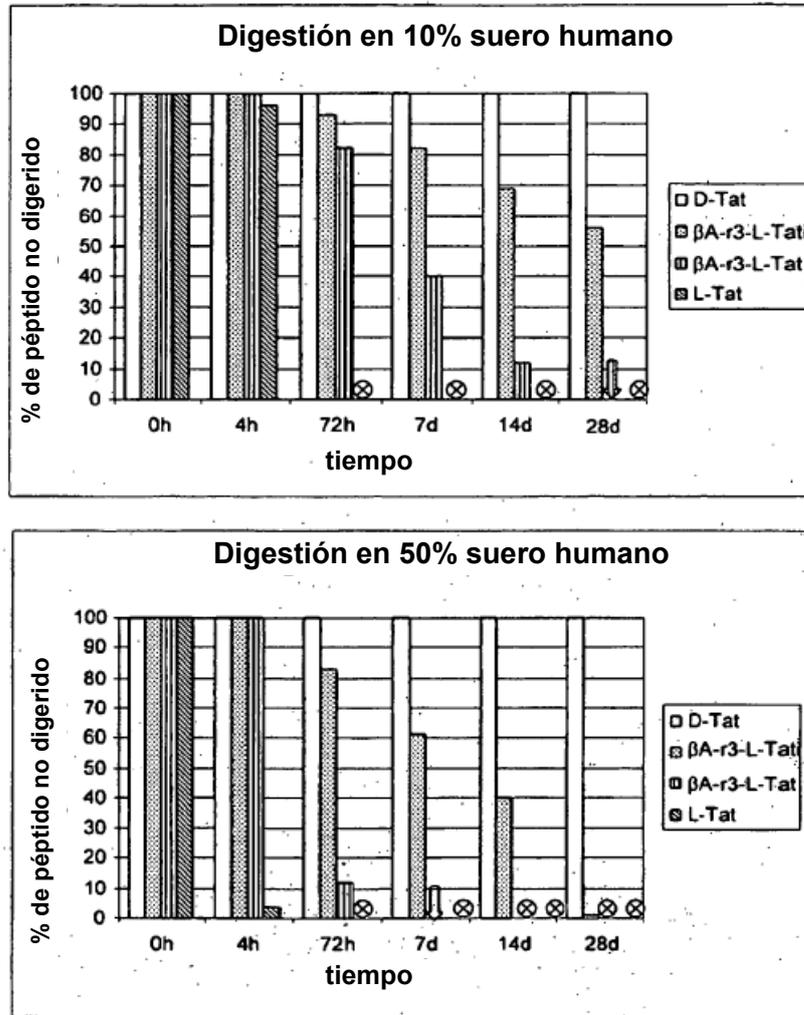
Fig. 1

Comparación de motivos transportadores de derivados de D/L-TAT (9 a.a.)

Nombre	Secuencia	MW	pI
L-TATi	RKKRRQRRR	1339.6	12.7
r3-TAT	rKKRrQRRr	1339.6	12.7
r3-TATi	rRRQrKKr	1339.6	12.7
D-TAT	rrqrkk	1339.6	12.7

Fig. 2

Estabilidad de nuevos transportadores en Suero Humano



⊗ = Tat completamente digerido ($M_w < 300$)
 ↓ = Fragmentos de Tat ($M_w < 300$)

Fig. 3

La protección N-terminal (β -Ala) no confiere mayor estabilidad

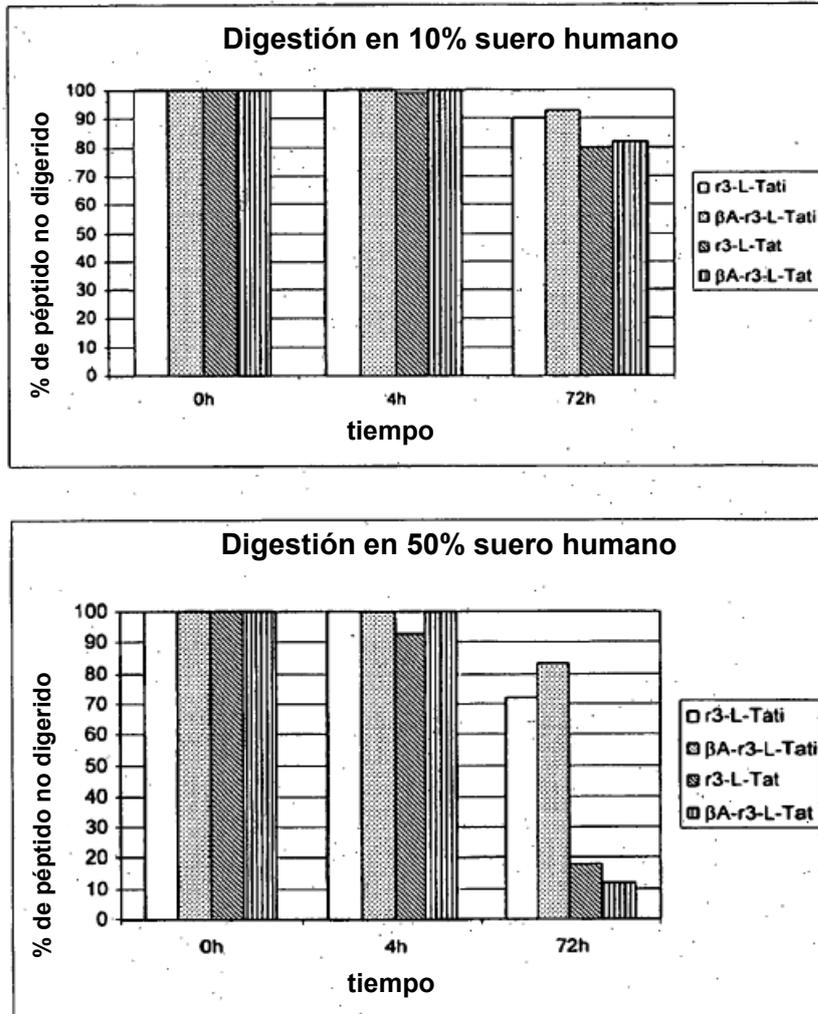


Fig. 4

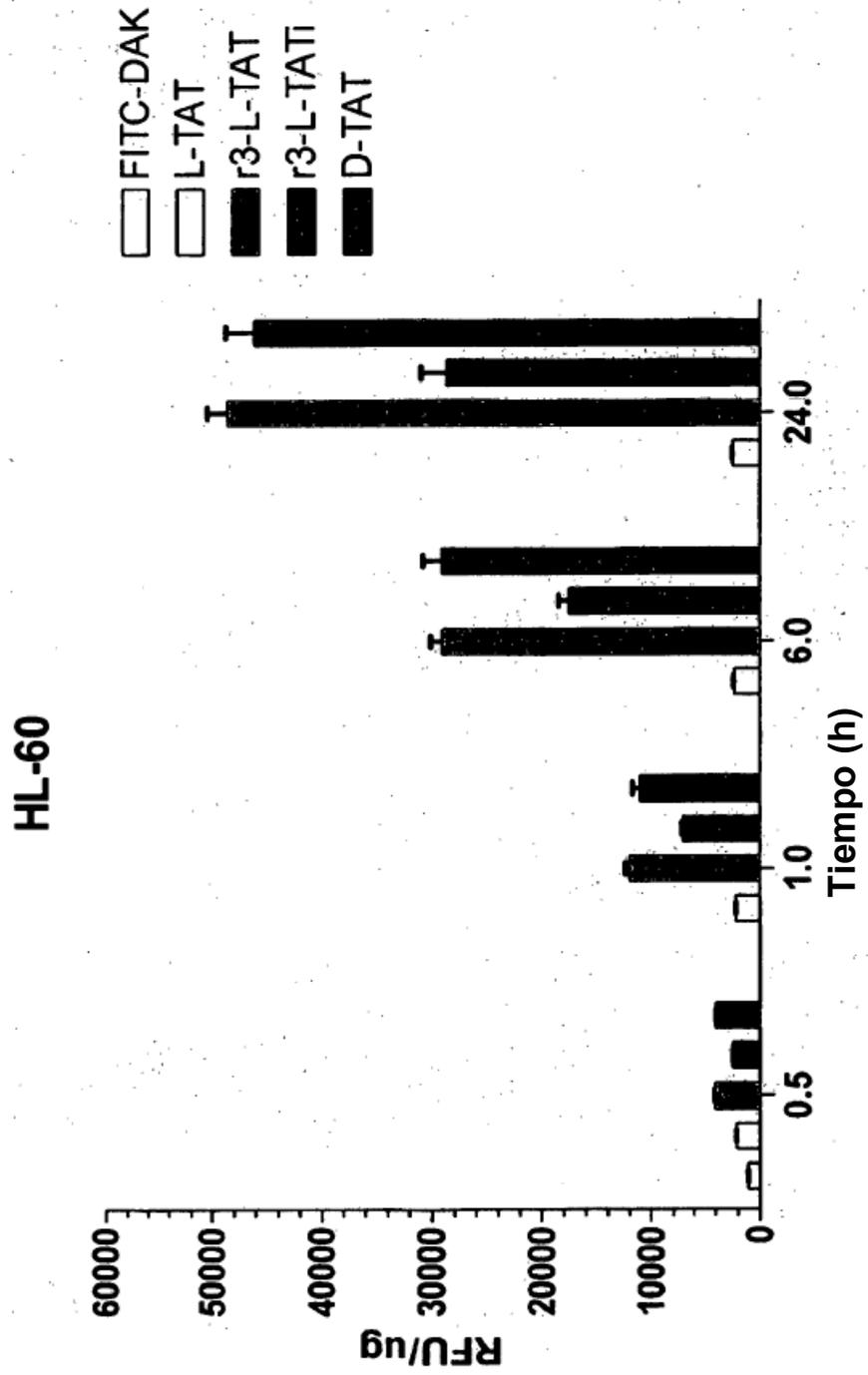


Fig. 5

Neuronas corticales - 24 h

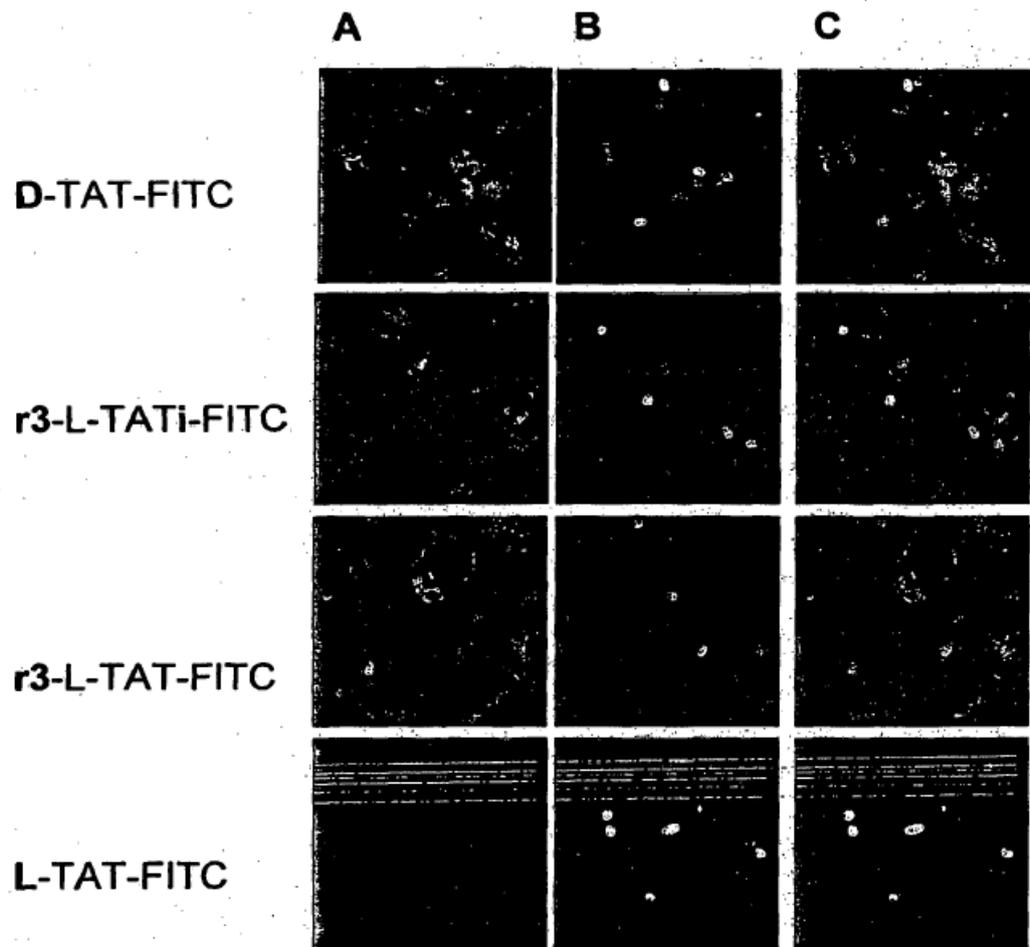


Fig. 6

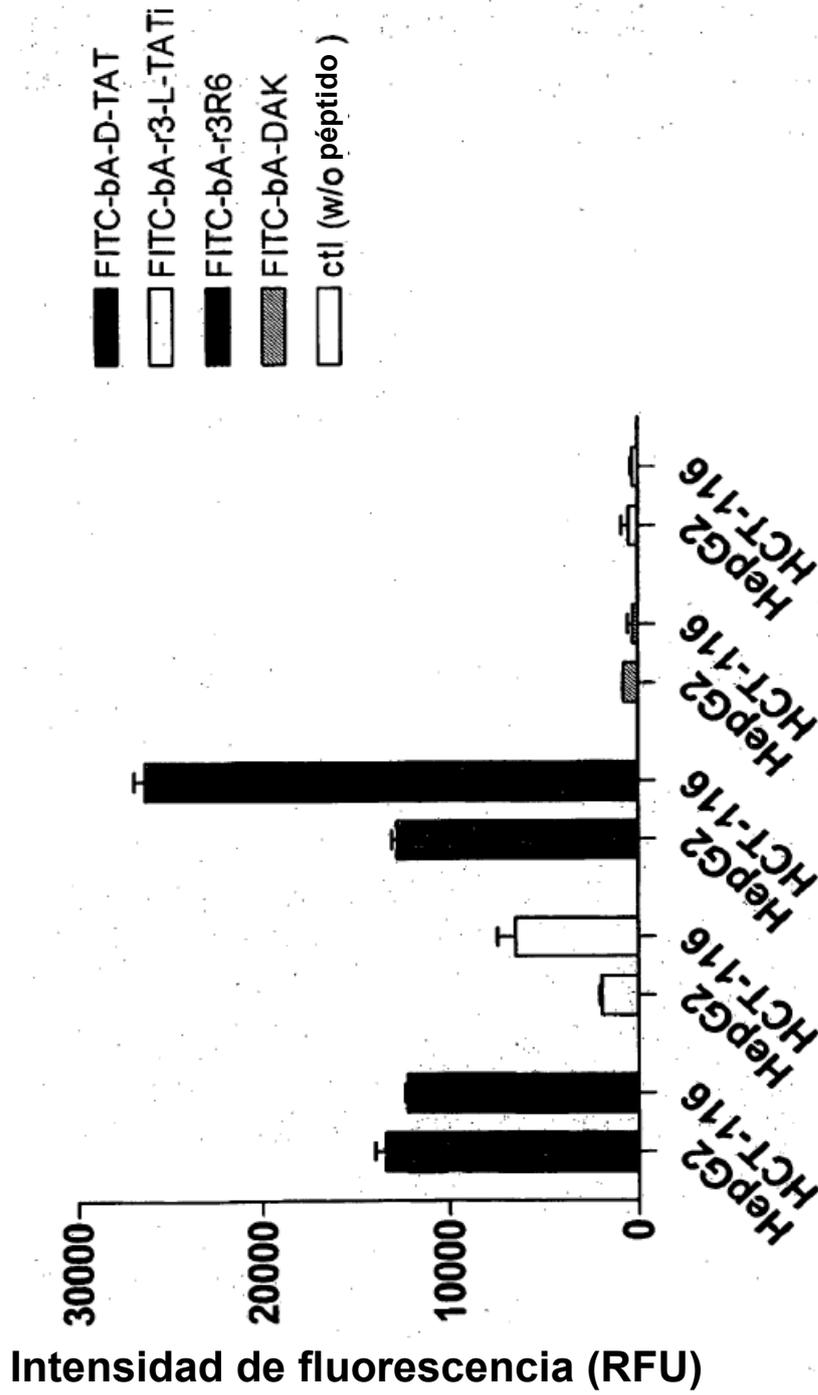


Fig. 7

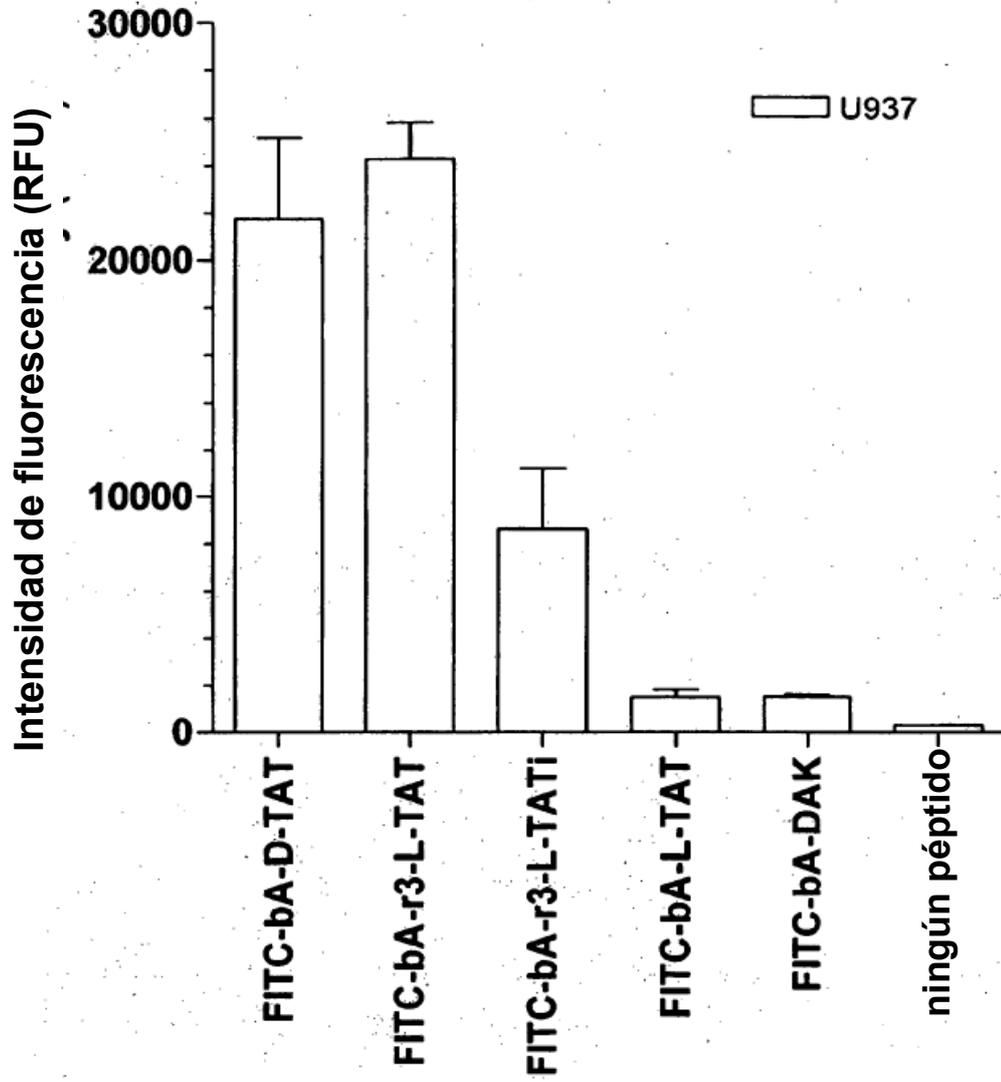


Fig. 8

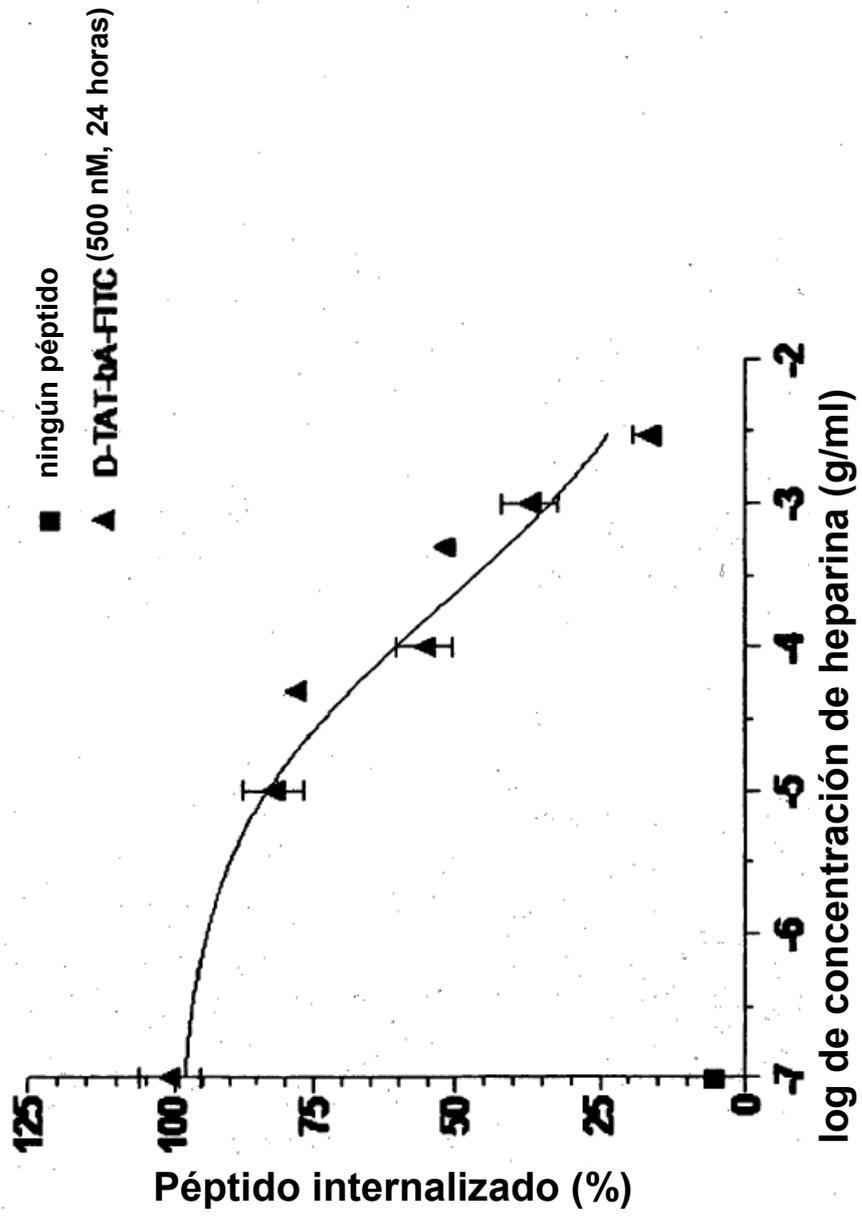


Fig. 9

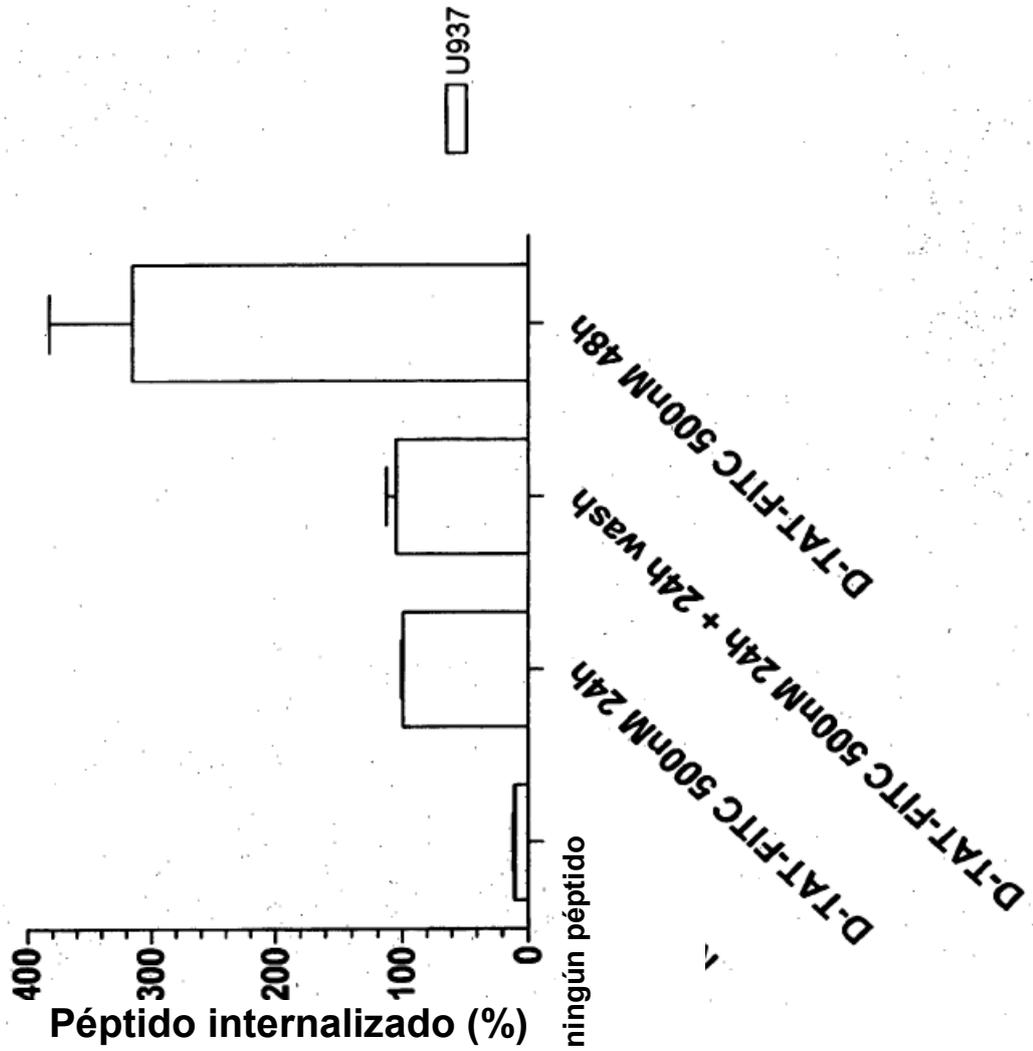


Fig. 10

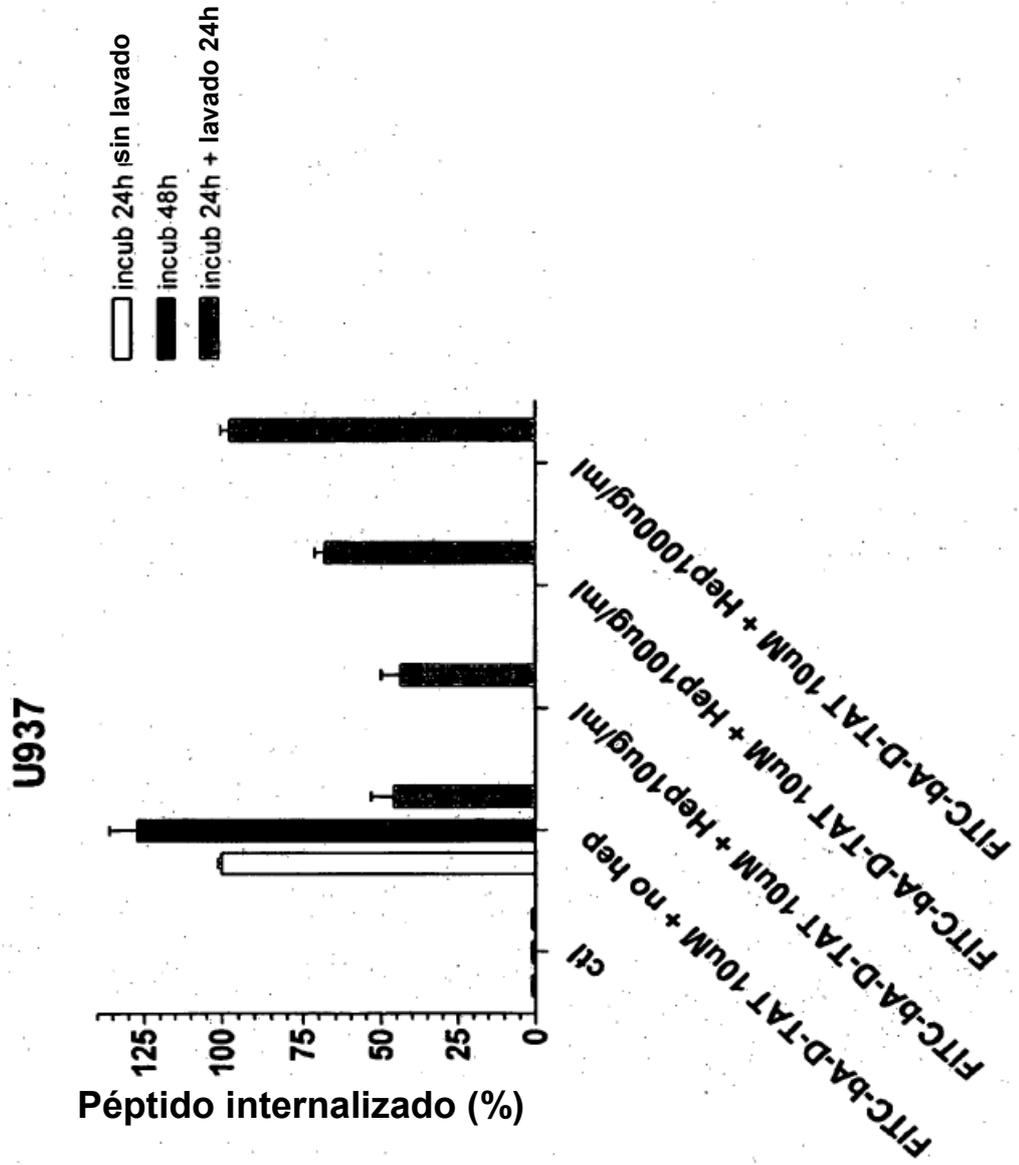


Fig. 11

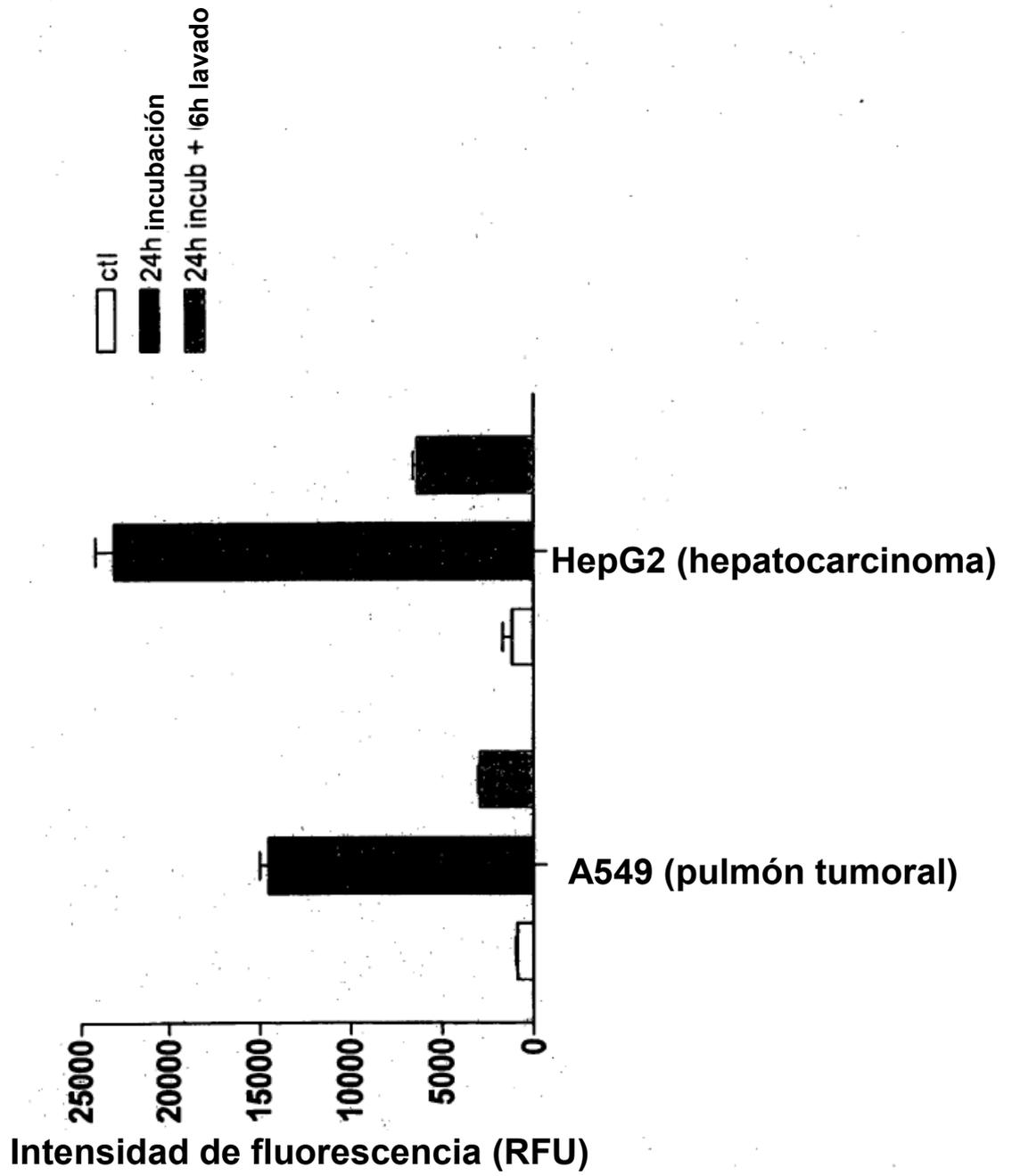


Fig. 12

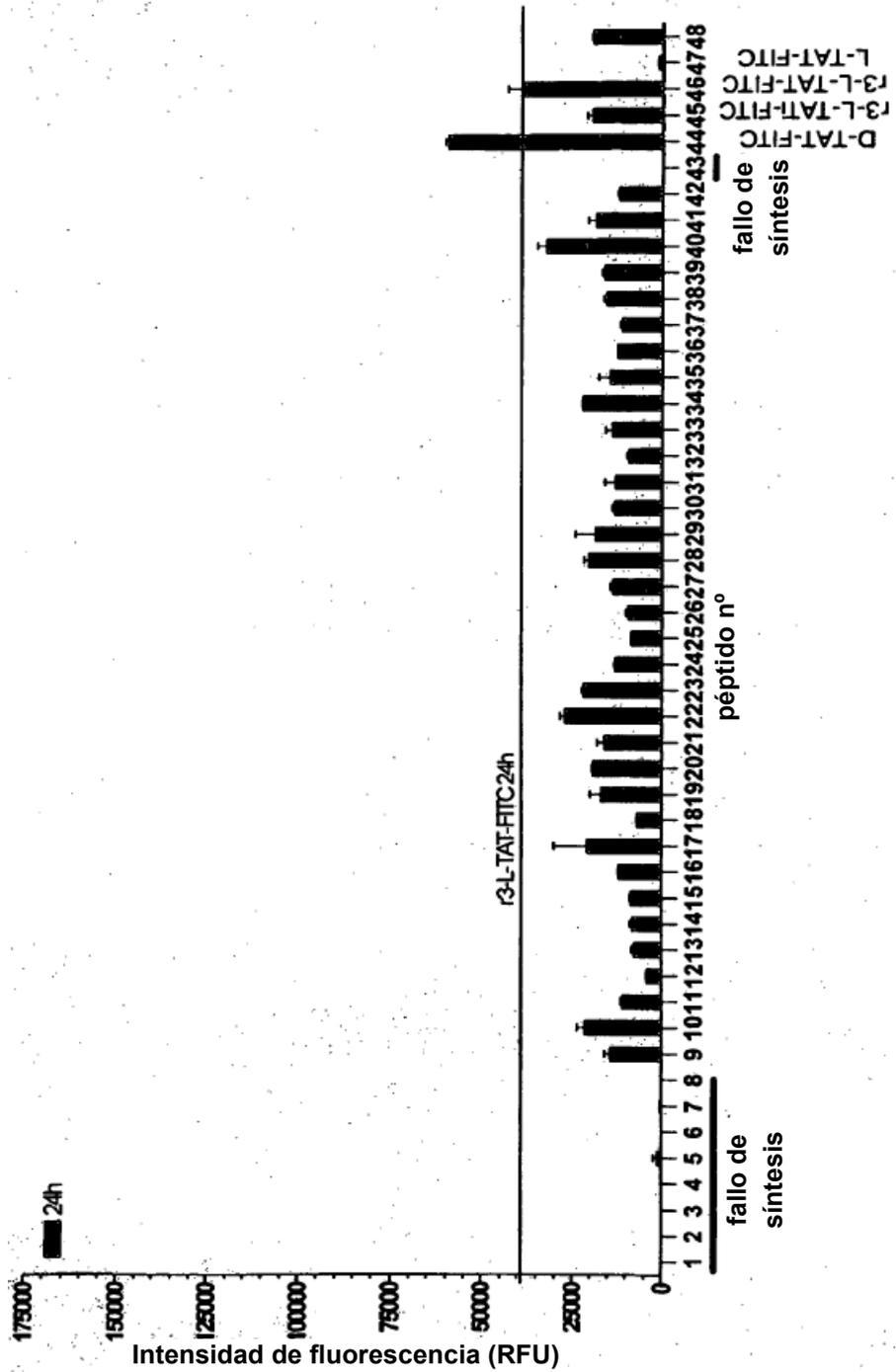


Fig. 13A

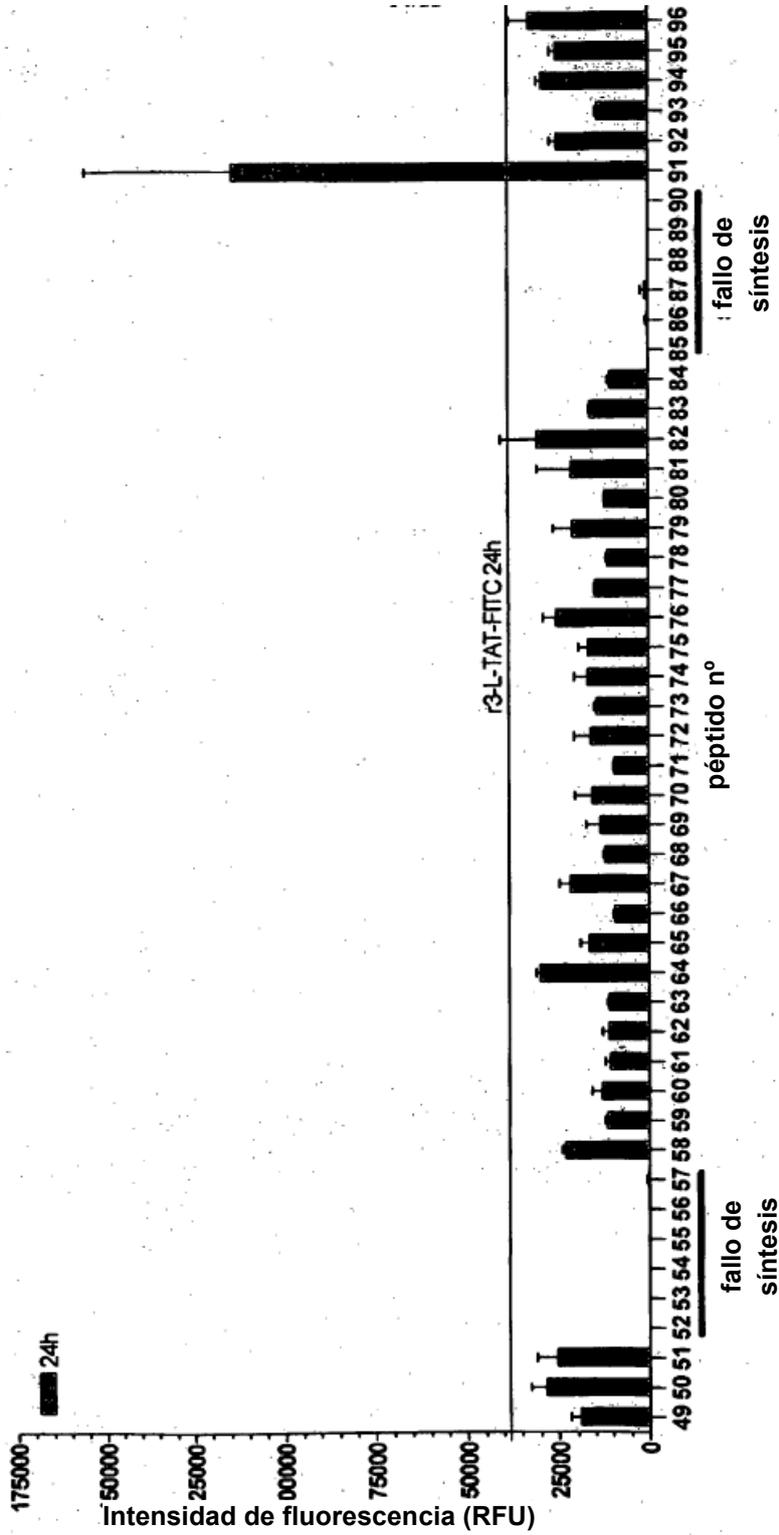


Fig. 13B

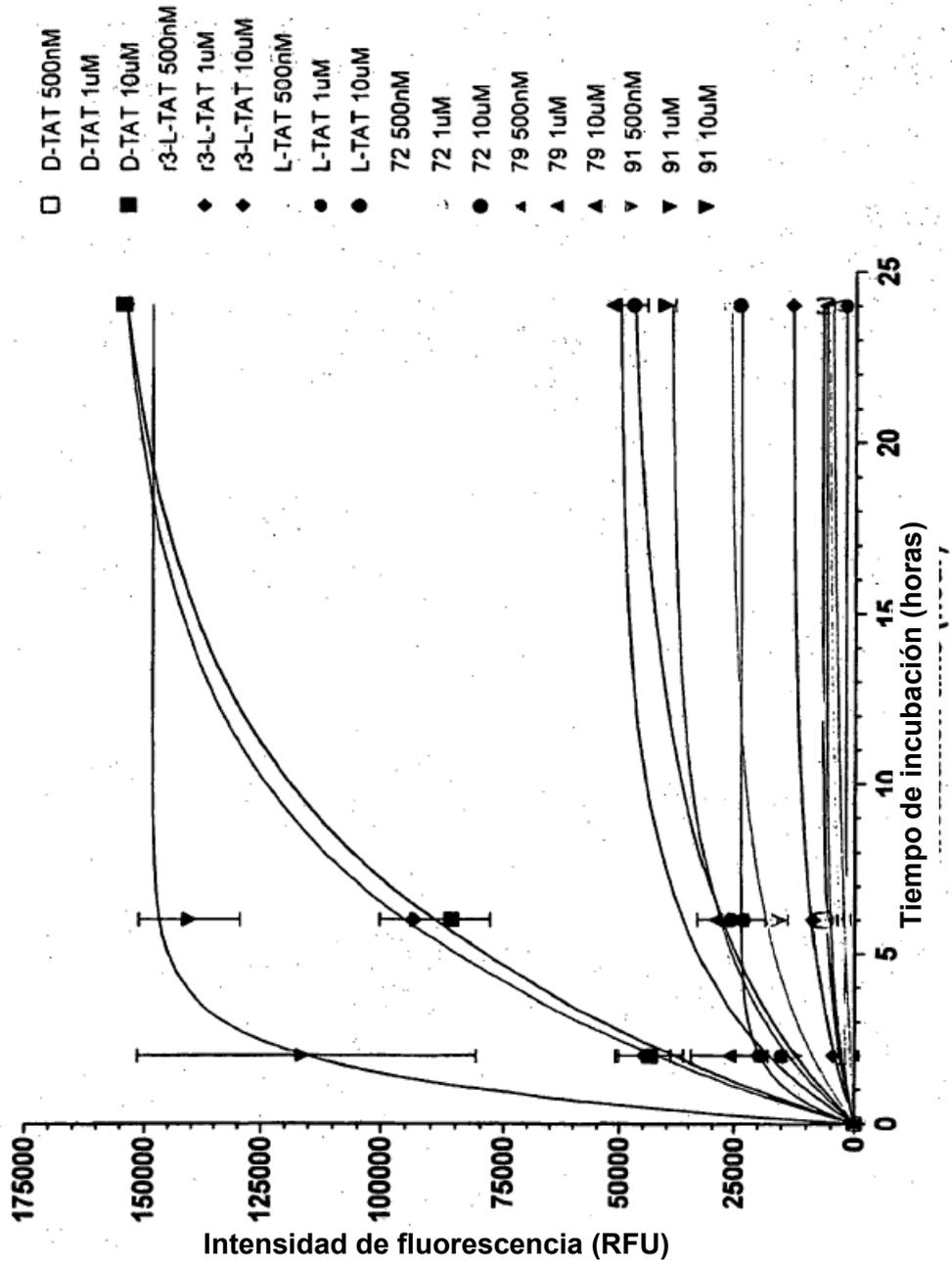


Fig. 14A

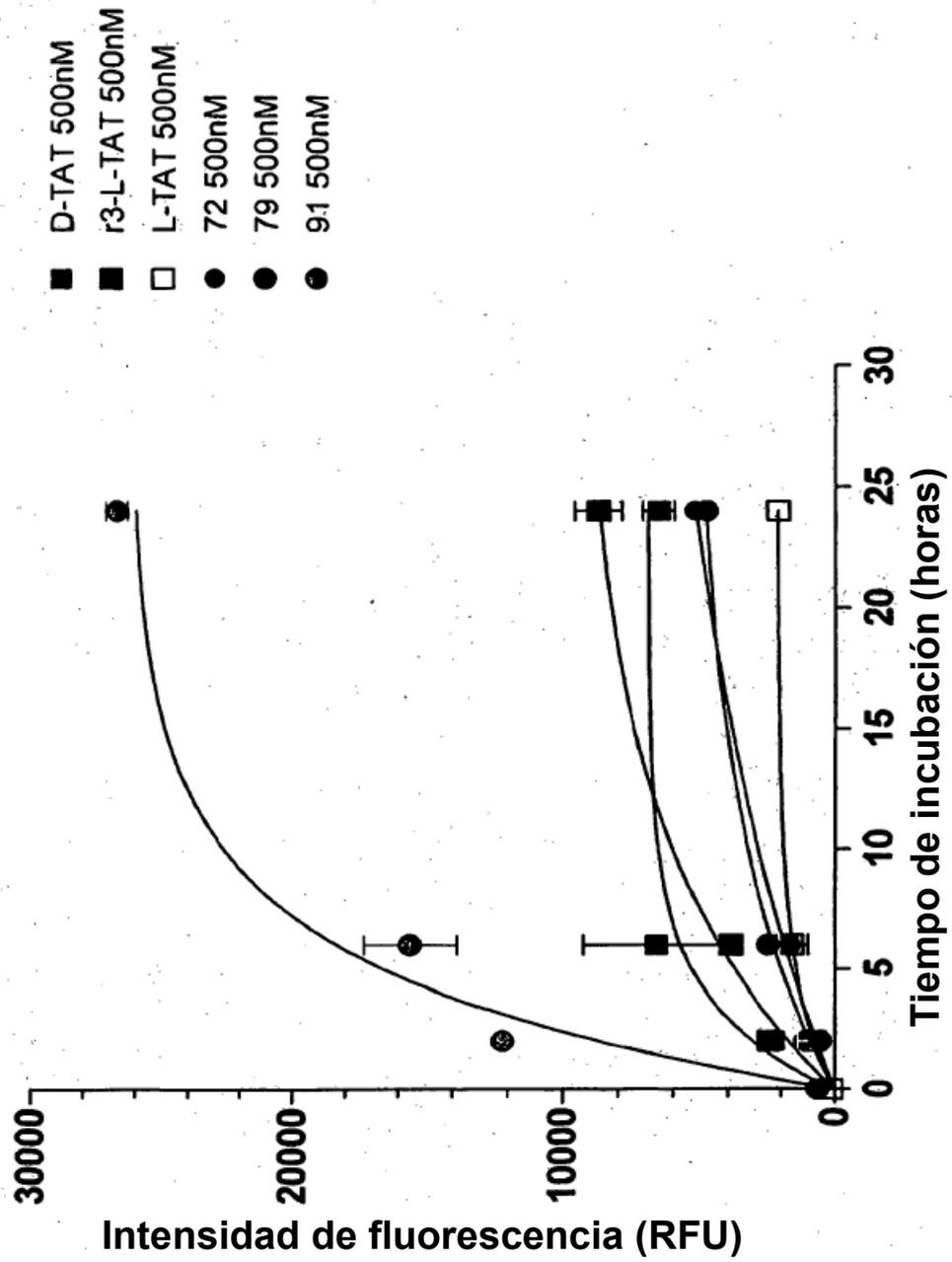


Fig. 14B

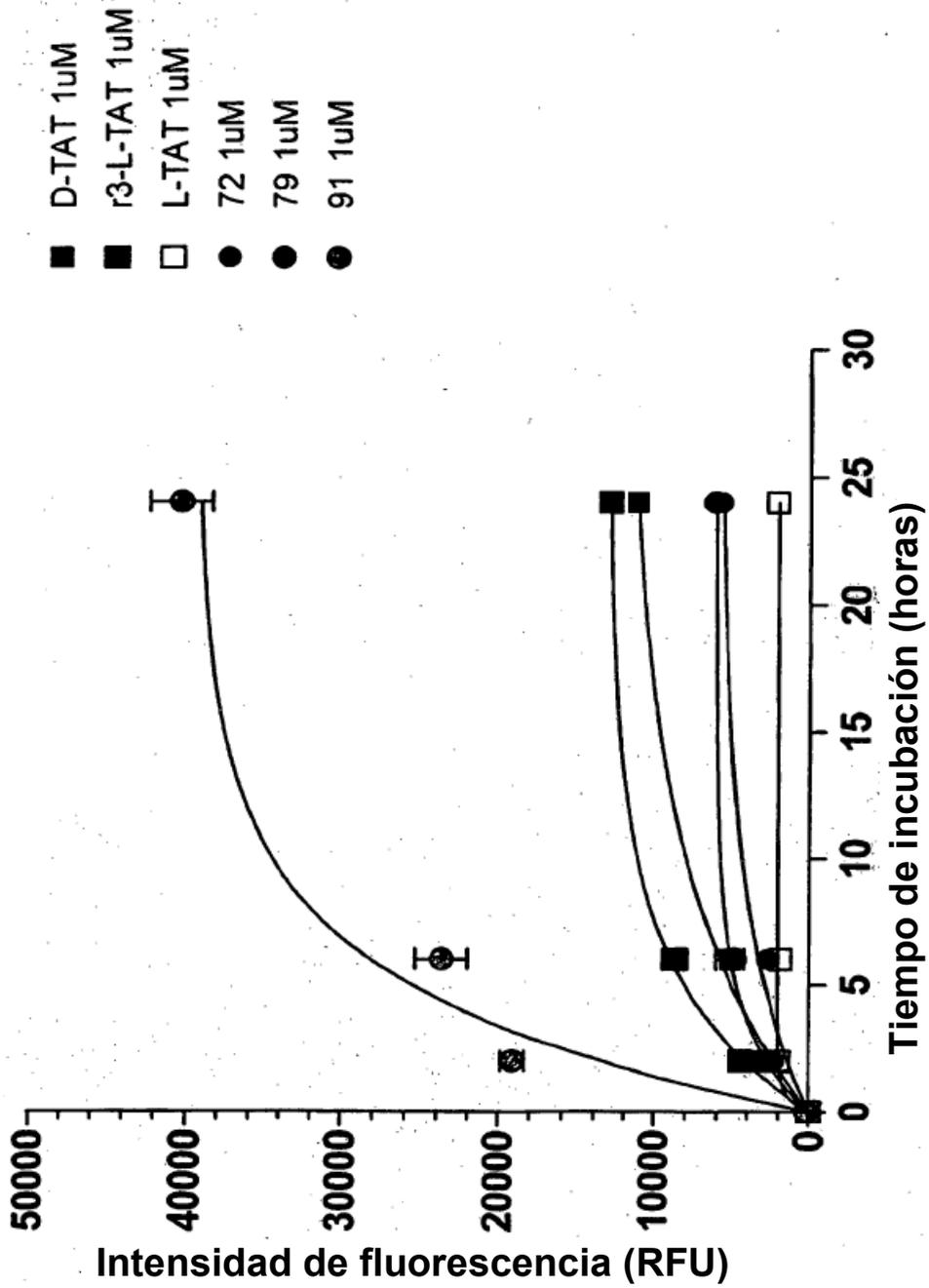


Fig. 14C

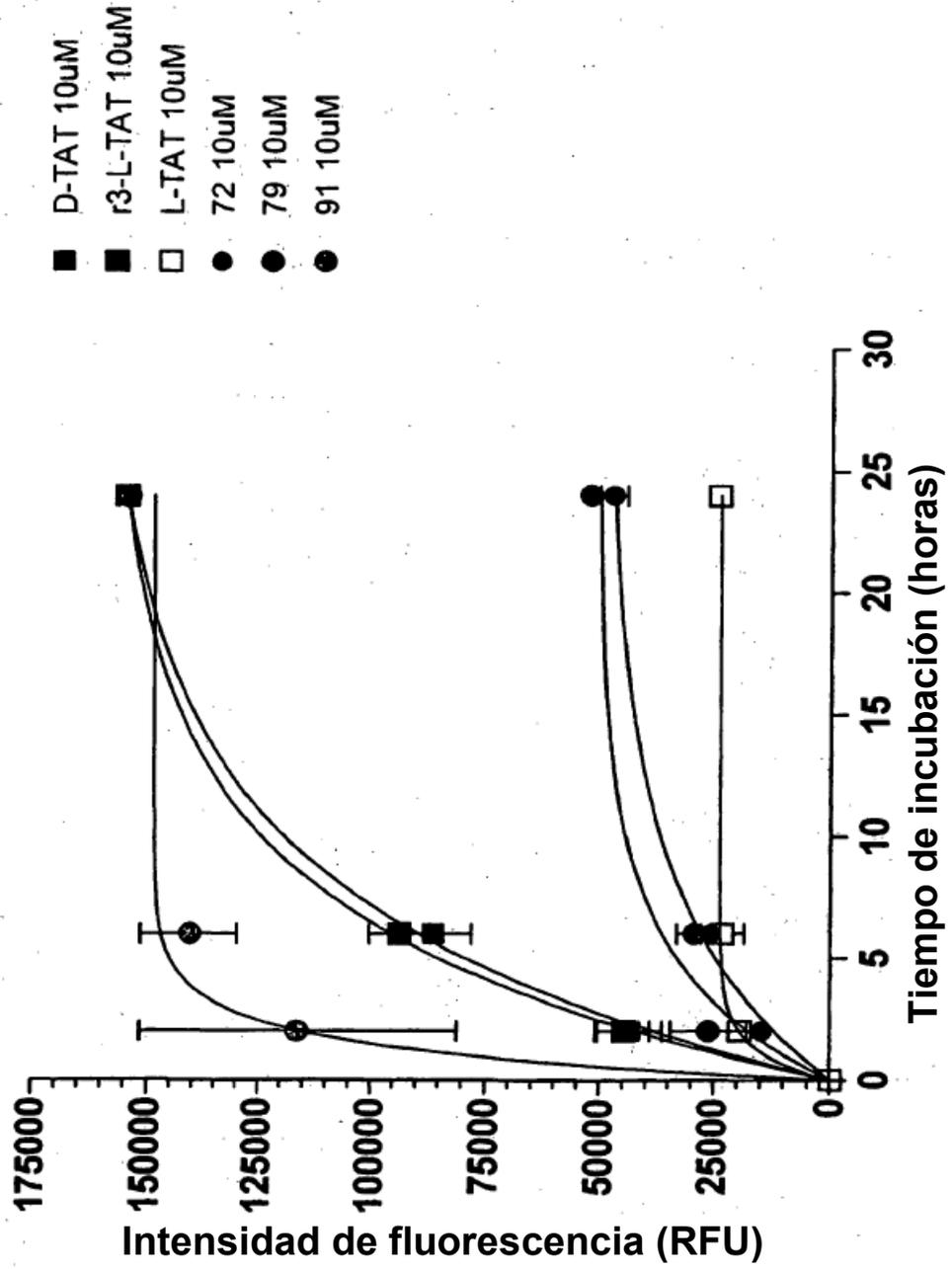


Fig. 14D

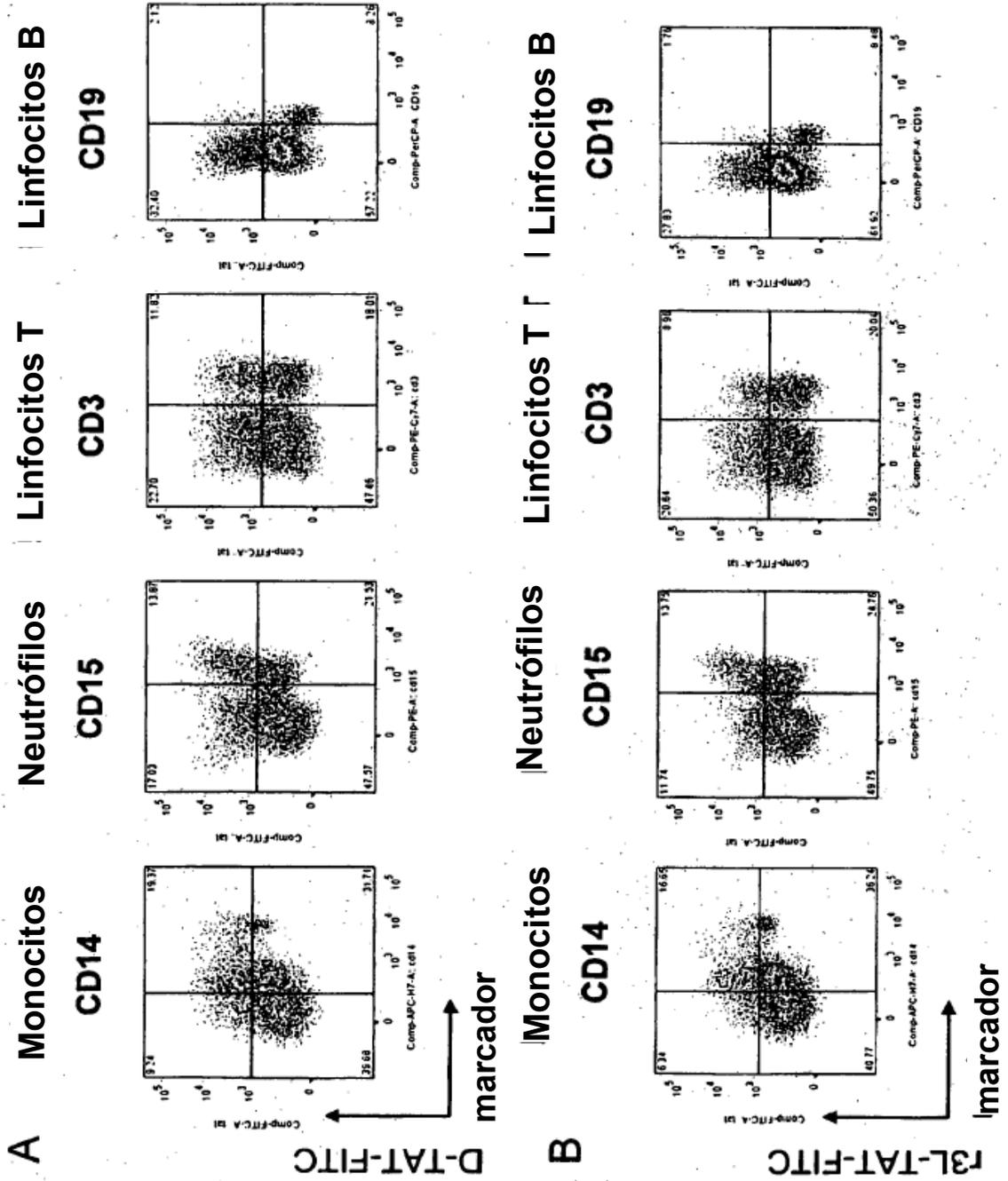


Fig. 15

	Monocitos	Neutrófilos	Linfocitos T	Linfocitos B
D-TAT	3510.30	1698.16	1551.66	1323.95
r3L-TAT	2952.56	1518.37	995.46	1051.82

Fig. 16

	SEQ ID N°:	Raw*	A549**	J77***	HepG2***	BMDM*
D-TAT	251	100	100	100	100	100
r3-L-TAT	20	107	147	51	210	65
12	37	30	41	13	73	41
19	44	12	77	10	95	12
20	45	45	147	20	210	33
21	46	83	131	39	187	61
28	53	156	155	35	170	149
33	58	69	53	19	64	54
41	66	65	109	28	123	100
60	85	54	67	21	94	28
64	89	150	149	71	237	120
80	105	63	106	26	171	26
83	108	70	114	41	102	59
92	117	48	100	24	203	28
93	118	57	86	29	173	37
94	119	136	195	75	235	84
95	120	78	88	19	119	98
96	121	75	133	33	176	64

Fig. 17

	SEQ ID N°:	Raw*	A549**	J77***	HepG2***	BMDM*
D-TAT	251	94	68	196	48	154
r3-L-TAT	20	100	100	100	100	100
12	37	28	28	25	35	63
19	44	11	52	19	45	18
20	45	42	100	39	100	51
21	46	78	89	77	89	94
28	53	146	105	68	81	229
33	58	64	36	37	31	82
41	66	61	74	56	59	154
60	85	51	45	41	45	43
64	89	141	101	139	113	185
80	105	59	72	52	81	41
83	108	66	78	81	49	91
92	117	45	68	47	97	43
93	118	54	58	56	83	56
94	119	128	133	146	112	129
95	120	73	60	38	57	150
96	121	70	91	65	84	99

Fig. 18