

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 122**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009** **E 18155330 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022** **EP 3338790**

54 Título: **Compuestos oligopeptídicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.02.2008 GB 0803352
26.09.2008 US 100584 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.05.2022

73 Titular/es:

APIM THERAPEUTICS AS (100.0%)
c/o Sparebank 1 Regnskapshuset SMN
Rådhusveien 12
7100 Rissa, NO

72 Inventor/es:

OTTERLEI, MARIT;
AAS, PER ARNE y
FEYZI, EMADOLDIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 912 122 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

Compuestos oligopeptídicos y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de agentes y composiciones farmacéuticas en terapia, particularmente en cualquier terapia en la que sea deseable o ventajoso reducir o prevenir la proliferación o el crecimiento de células, tal como en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, o de hecho cualquier afección que requiera o que sea sensible a una terapia citostática. La invención se basa en la identificación de nuevas interacciones entre el antígeno nuclear de las células en proliferación (PCNA) y varias proteínas implicadas en la reparación del ADN, el mantenimiento y la regulación del ciclo celular, y en la consecuente identificación de un nuevo motivo pentapéptido responsable de dichas interacciones, que hemos denominado APIM. Consecuentemente, la presente invención se refiere más particularmente al uso de péptidos o a miméticos de los mismos que comprenden dicho motivo y a secuencias de señalización que son capaces de interactuar con el PCNA, y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos agentes y al uso de dichos agentes en terapia, particularmente en terapias que impliquen la reducción o la prevención de la proliferación celular, como se ha indicado anteriormente.

20 Antecedentes de la invención

Las células humanas y animales están expuestas a una diversidad de causas de daños en el ADN, tales como especies de oxígeno reactivas, luz UV, rayos X y agentes citostáticos endógenos o exógenos.

Los agentes citostáticos son agentes que inhiben o suprimen el crecimiento y/o la multiplicación celular (proliferación/replicación), por ejemplo, dañando el ADN o interfiriendo con la maquinaria de replicación celular. Los agentes alquilantes son una clase de agentes citostáticos, algunos de los cuales se usan en clínica o con fines de investigación.

Los agentes alquilantes causan daños en el ADN mediante la modificación de las bases en los átomos de N o de O. El tipo de daño depende del tipo de agente, causando la mayoría de los agentes una modificación específica en el ADN. Los daños en el ADN incluyen aductos de alquilación y reticulaciones entre hebras que pueden dar lugar a una mala codificación durante la replicación y/o a bloques de replicación seguidos por rupturas de las dobles hebras o una síntesis de translesión.

Las células humanas y animales poseen diversos sistemas de reparación del ADN que incluyen una reparación por escisión de bases, una reparación por escisión de nucleótidos y una reparación del malapareamiento. Un ejemplo es la desmetilasa oxidante del ADN humano, la hABH2, que reconvierte la 3-metilcitosina (3meC) en citosina y la 1-metiladenina (1meA) en adenina mediante una desmetilación oxidante.

Una estrecha coordinación entre la reparación del ADN y la replicación del ADN regulada por el ciclo celular es esencial para la integridad del genoma. Es importante que, en presencia de daños, la replicación del ADN se detenga hasta que el daño haya sido reparado, de otro modo se producen las mutaciones y se propagan. Una proteína que se sabe que está implicada tanto en la replicación del ADN como en la reparación del ADN es el antígeno nuclear de las células en proliferación (PCNA).

El PCNA es un miembro de la familia de proteínas de abrazadera deslizante que está funcionalmente conservado desde las bacterias hasta los eucariotas superiores, y cuya principal función es proporcionar polimerasas replicativas con la elevada procesabilidad necesaria para la duplicación del genoma. En las células vivas en fase S, el PCNA marcado con proteína fluorescente verde (GFP) forma unos claros focos que representan los sitios de replicación. Por lo tanto, puede ser usado como un marcador de la fase S.

Numerosas proteínas implicadas en los procesos celulares, tales como la reparación del ADN, el ensamblaje de la cromatina, la epigenética y el remodelado de la cromatina, la cohesión de cromátidas hermanas, el control del ciclo celular y la supervivencia, están localizadas en las denominadas factorías de replicación, que contienen más de una docena de horquillas de replicación. Muchas de estas proteínas interactúan con el PCNA a través de la conservada secuencia peptídica de interacción con el PCNA denominada caja PIP (QxxL/I/MxxF/DF/Y), en la que x puede ser cualquier aminoácido. Un motivo de unión al PCNA alternativo denominado caja KAx fue identificado mediante el uso de una biblioteca de expresión peptídica, pero no se ha verificado que este motivo peptídico sea importante para las interacciones con el PCNA *in vivo*.

Varias proteínas interactúan con el PCNA, y se ha demostrado que algunas de estas proteínas, incluyendo la hABH2, se colocan con el PCNA en los focos de replicación. Sin embargo, la colocación en sí misma no implica que haya alguna interacción directa o indirecta entre las proteínas colocadas. De hecho, la ausencia en la hABH2 de motivos de unión al PCNA tales como la caja PIP o la caja KAx sugeriría que la hABH2 no interactúa con el PCNA.

El documento IN 851 CH 2005 A describe péptidos que son mutéfnas del sitio activo del factor de crecimiento básico

de fibroblastos (bFGF) y su uso en el tratamiento de vitligo.

Peng et al. (Archives of Virology, 2002, vol. 147(1), p. 21-41) describe el análisis de los genomas completos de trece variantes de virus TT y desvela la secuencia peptídica AB064608 (n.º de registro de UniProt Q8V7F3).

Descripción de la invención

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En el trabajo que ha dado lugar a la presente invención, los inventores han averiguado sorprendentemente que diversas proteínas interactúan con el PCNA a través de un nuevo motivo de interacción con el PCNA. En una de estas proteínas, la hABH2, este motivo está localizado en el N terminal. Los inventores establecieron que este motivo es tanto esencial como suficiente para la interacción con el PCNA (véase el véase el Ejemplo 1).

Como se explica con más detalle en los siguientes Ejemplos, para explorar la función de este motivo de interacción con el PCNA en la reparación del ADN de los daños alquilantes, se expusieron líneas celulares que expresan un péptido recombinante que comprende el motivo a varias dosis de MMS (metansulfonato de metilo) que es un agente alquilante S_N2 que causa la formación de 3-metilcitosina y de 1-metiladenina. Se averiguó que la expresión del péptido recombinante que comprende el motivo sensibilizaba a las células frente a los daños en el ADN causados por el MMS, lo que indica que el péptido recombinante que comprende el motivo inhibe competitivamente la interacción entre el PCNA y la hABH2.

También se ensayaron otros agentes, incluyendo el BCNU, la temozolomida (TZA) y la mitomicina c (MMC), que causan otros tipos de daños en el ADN, y para su mayor sorpresa, los inventores averiguaron que el péptido recombinante que comprende el motivo también sensibilizaba a las células frente a los daños causados por estos agentes. Esto era totalmente inesperado debido a que el BCNU es un agente O^6 -cloroetilante que principalmente da lugar a reticulaciones entre las hebras, así como a algunos aductos cíclicos monobásicos (1,N(6)etanoadenina), se ha notificado que la TZA es un agente metilante O^6 G y que la MMC causa reticulaciones entre las hebras a través de la N-alkilación de la guanina en CpGs, y que la hABH2 no repara estos tipos de daños en el ADN. En su lugar, existen otras enzimas que preparan este tipo de daño, por ejemplo, los daños por la TZA son reparados directamente por la transferasa de O^6 -metilguanina-ADN (MGMT). Estos hallazgos indican que el péptido recombinante que comprende el motivo no inhibe simplemente la interacción entre la hABH2 y el PCNA, y que puede haber implicadas otras proteínas, a saber, que otras proteínas pueden interactuar con el PCNA a través del nuevo motivo.

Los inventores también averiguaron que la expresión del péptido recombinante que comprende el motivo aumentaba el efecto citotóxico de los agentes citostáticos (específicamente del MMS) más allá de lo que se observaba en las líneas celulares de ratones inactivados para la ABH2, es decir, ratones que no poseen la ABH2, lo que indica adicionalmente que el péptido recombinante que comprende el motivo tiene un efecto con un alcance más amplio y probablemente inhibe otras proteínas además de la hABH2.

Estos sorprendentes hallazgos han conducido a los inventores a proponer un uso terapéutico para un péptido que comprende un motivo de unión al PCNA.

El nuevo motivo de unión al PCNA divulgado en el presente documento, denominado APIM, ha sido caracterizado y puede ser definido como sigue:

$X_1X_2X_3X_3'X_1'$ (SEQ ID NO: 1),

en el que X_1 y X_1' se seleccionan independientemente entre el grupo de aminoácidos básicos, X_2 es un aminoácido lipófilo, y X_3 y X_3' se seleccionan independientemente entre el grupo de aminoácidos sin carga, preferentemente no polares.

Un péptido (o un compuesto oligopeptídico) capaz de interactuar con el PCNA puede contener o comprender dicho motivo peptídico (o secuencia). Por lo tanto, en el presente documento se divulga un compuesto oligopeptídico capaz de interactuar con el PCNA y que comprende dicho motivo.

Por lo tanto, en una invención, la presente invención proporciona un compuesto oligopeptídico que comprende un motivo de interacción con PCNA, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho compuesto oligopeptídico, para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo,

en el que el motivo de interacción con PCNA es $[R/K]-[W/F/Y]-[L/I/V/A/M]-[V/L/I/A/M]-[K/R]$ (SEQ ID NO. 28),

en el que el compuesto oligopeptídico tiene menos de 70 subunidades y comprende un péptido de penetración celular que comprende un oligómero de 5 a 20 aminoácidos básicos.

5 El compuesto oligopeptídico puede comprender además una secuencia de señalización de localización nuclear. Como se ha mencionado anteriormente, se ha determinado que el nuevo motivo divulgado en el presente documento media en la interacción de un compuesto oligopeptídico (por ejemplo, un péptido), o de una proteína que contiene dicho motivo, con el PCNA.

10 La interacción puede ser directa o indirecta, y puede implicar la unión directa del motivo al PCNA, o el motivo puede unirse indirectamente, por ejemplo, la unión puede estar mediada por otra molécula. Esta referencia a "interacción con el PCNA" o "unión al PCNA" puede incluir por lo tanto cualquier forma de interacción, y una unión tanto directa como indirecta.

15 Cualquier referencia en el presente documento a un "motivo" debería entenderse que significa un motivo de interacción con PCNA como se expone en SEQ ID NO. 28.

20 Por lo tanto, el compuesto oligopeptídico para su uso como se define anteriormente comprende el motivo [R/K]-[F/Y/W]-[L/I/V/A/M]-[L/I/V/A/M]-[K/R] (SEQ ID NO. 28), en el que dicho compuesto oligopeptídico es capaz de interactuar con PCNA.

En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[Y/W]-[L/I/V/A/M]-[L/I/V/A/M]-[K/R] (SEQ ID NO: 29).

En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[F/Y/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] (SEQ ID NO: 30).

25 En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[Y/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] (SEQ ID NO: 31).

En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[F/W]-[L/I/V/A/M]-[L/I/V/A/M]-[K/R] (SEQ ID NO: 32).

30 En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[F/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] (SEQ ID NO: 33).

En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[F/W]-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 34).

En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[F/Y/W]-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 35).

35 En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-[Y/W]-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 36).

En otra realización el motivo puede definirse como: [K/R]-F-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 37).

El compuesto oligopeptídico es preferentemente un compuesto aislado.

40 En una realización preferida, el compuesto oligopeptídico tiene o comprende la secuencia RFLVK (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones preferidas, el compuesto oligopeptídico tiene o comprende una secuencia seleccionada de KFLLR (SEQ ID NO: 3), KYLLR (SEQ ID NO: 4), KWLLR (SEQ ID NO: 5), KYILR (SEQ ID NO: 6), KYVLR (SEQ ID NO: 7), RFLLR (SEQ ID NO: 8), RYLLR (SEQ ID NO: 9), RWLLR (SEQ ID NO: 10), RYILR (SEQ ID NO: 11), RYVLR (SEQ ID NO: 12), RFLIR (SEQ ID NO: 13), RYLVR (SEQ ID NO: 14), RWLMR (SEQ ID NO: 15), RYVLR (SEQ ID NO: 16), RYVIR (SEQ ID NO: 17), RWLVK (SEQ ID NO: 18), RYLK (SEQ ID NO: 19), RWLIK (SEQ ID NO: 20), RWIVK (SEQ ID NO: 21), RWVVK (SEQ ID NO: 22), RWAVK (SEQ ID NO: 23), RYVVK (SEQ ID NO: 24), RYLIK (SEQ ID NO: 25) o RYLMK (SEQ ID NO: 26). Estas secuencias específicas se enumeran a modo de ejemplo.

50 El compuesto oligopeptídico para su uso como se define anteriormente también comprende una secuencia de señalización que facilita la entrada del compuesto en una célula y opcionalmente una secuencia que localiza el compuesto a un compartimento intracelular específico, preferentemente el núcleo.

55 Una secuencia de señalización puede contemplarse como cualquier secuencia que actúe para ubicar, o como alternativa, poner, dirigir, translocar o transportar, el compuesto oligopeptídico a cualquier ubicación deseada, por ejemplo, a cualquier ubicación celular o subcelular deseada. La ubicación deseada puede ser una célula (es decir, el interior de una célula) y opcionalmente el núcleo de una célula.

60 Una secuencia de señalización que actúa para transportar el compuesto oligopeptídico a una célula, o a través de una membrana celular (es decir, al interior de una célula) se denomina "péptido de penetración en la célula" (también conocido en la materia como dominio de transducción de proteínas (PTD) o secuencia de transducción de proteínas).

65 La tecnología del péptido de penetración en la célula (CPP) se ha desarrollado en gran medida en los años recientes, y en la materia se conoce y se ha descrito una gran diversidad de péptidos de penetración en la célula, y de hecho hay un amplio abanico de dichos péptidos disponibles en el mercado. Los péptidos de penetración en la célula pueden variar ampliamente en tamaño, secuencia y carga, y de hecho en su mecanismo de funcionamiento (que actualmente

no es conocido para algunos péptidos y no está completamente elucidado para otros), pero comparten la capacidad común de translocarse a través de la membrana plasmática y administrar una fracción unidad o asociada (la denominada "carga") en el citoplasma, o incluso en algunos casos en el núcleo, de una célula. Por lo tanto, los CPP son vectores de administración basados en péptidos.

Los CPP pueden derivar de proteínas naturales que son capaces de translocarse a través de las membranas celulares, tales como la proteína de la caja homeótica Antennapedia de *Drosophila* (un factor de transcripción), proteínas víricas tales como el factor de transcripción TAT del VIH-1 y la proteína de la cápside VP22 del HSV-1, y o pueden ser sintéticos, por ejemplo, de proteínas quiméricas o de polipéptidos sintéticos tales como la poliarginina. Como se ha mencionado anteriormente, no existe un único mecanismo responsable del efecto de transducción, y por lo tanto el diseño de los CPP puede basarse en diferentes estructuras y secuencias. Los péptidos de penetración en la célula son revisados en Jarver et al. 2006 Biochimica et Biophysica Acta 1758, páginas 260-263, y en la siguiente Tabla 2 se recogen varios péptidos representativos. El documento US 6.645.501 describe adicionalmente varios péptidos de penetración en la célula.

TABLA 2

CPP	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>Clase Antp</i>		
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 38)	Bolton (2000) Eur. J. Neuro. 12: 287
Derivados de la penetratina	RRMKWKK (SEQ ID NO: 39)	Documento US 6472507
	NRRMKWKK (SEQ ID NO: 40)	Documento EP4855781
	QNRRMKWKK (SEQ ID NO: 41)	Documento WO 97/12912
	FQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 42)	
	RREKWKK (SEQ ID NO: 43)	
	RRQKWKK (SEQ ID NO: 44)	
	KRMKWKK (SEQ ID NO: 45)	
	RKMKWKK (SEQ ID NO: 46)	
	RROKWKK (SEQ ID NO: 47)	
	RRMKQKK (SEQ ID NO: 48)	
	RRMKWFK (SEQ ID NO: 49)	
	RORKWKK (SEQ ID NO: 50)	
	RRMWKKK (SEQ ID NO: 51)	
	RRMKKWK (SEQ ID NO: 52)	
	(usando la notación de aminoácidos individuales convencional, ornitina (O), ácido diaminobutírico (B), norleucina (N))	
D-Penetratin	rqikiwfnrrmkwkk (SEQ ID NO: 53)	Rouselle, C. et al. (2000) Mol. Pharm 57: 679
<i>Clase Protegrina</i>		
Pegelina (SynB)	RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 54)	Rouselle, C. et al. (2000) Mol. Pharm 57: 679
<i>Clase TAT del VIH</i>		
TAT del VIH	GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 55)	Vives E., J Biol, Chem 1997, 272: 16010 Snyder (2004) PLOS 2: 186
47-57 del TAT del VIH	YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 56)	Potocky et al. (2003) JBC
VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRVD (SEQ ID NO: 57)	Elliott g. Cell 1997, 88: 223-233

(continuación)

CPP	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>Péptidos anfipáticos</i>		
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA (SEQ ID NO: 58)	Morris MC., Nat Biotechnol. 2001, 19: 1173-1176
Transportano	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 59)	Pooga M, FASEB J 1998, 12: 67-77
Transportano-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 60)	Soomets U, Biochim Biophys Acta 2000, 1467: 165-176
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (SEQ ID NO: 61)	Oehike J., Biochim Biophys Acta 1998, 1414: 127-139
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 62)	Wyman Biochemistry 1997, 36: 3008-3017
Pep-2	KETWFETWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 63)	
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV (SEQ ID NO: 64)	Wagstaff KM Curr Med Chem 2006, 13: 1371-1387
Péptidos Vectocell	VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 65) SRRARRSPRHLGSG* (SEQ ID NO: 66) LRRERQSRLRRERQSR* (SEQ ID NO: 67) GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 68) * indica la adición de una cys para la conjugación con la carga	Coupade (2005) Biochem. J. 407
Transportador Wr-T	KETWWETWWTEWWTEWSQ-GPG-rrrrrrr (SEQ ID NO: 69) r = enantiómero D de la arginina	Kondo (2004) Mol. Can. Thera 1623
<i>Otros péptidos</i>		
R7	RRRRRRR (SEQ ID NO: 70)	Rothbard <i>et al.</i> , Nat. Med 6 (2000) 1253-1257

Los CPP derivados de Antennapedia (clase Antp) basada en aproximadamente los 16 aminoácidos de la secuencia del Penetratin según se muestra en la Tabla 2, que se corresponde con el tercer bucle de la proteína antennapedia, y se demostró que era responsable de la translocación de la proteína. El Penetratin ha sido ampliamente desarrollado como vehículo de administración, incluyendo particularmente para uso farmacéutico, y se ha propuesto y descrito una amplia variedad de derivados y secuencias modificadas del Penetratin. Se hace referencia en particular al documento WO 91/1891, al documento WO 00/1417, al documento WO 00/29427, al documento WO 2004/069279 y al documento US 6.080.724. Por lo tanto, la secuencia de 16 aminoácidos del Penetratin puede ser modificada y/o truncada, o el péptido puede ser modificado químicamente, o pueden elaborarse análogos retro-, inverso- o retro-inverso conservando la actividad de penetración en la célula.

Otro grupo de péptidos de penetración en la célula que pueden usarse ventajosamente se basan en la secuencia del TAT del VIH y en el TAT del VIH y en fragmentos de los mismos representan una clase preferida de CPP para su uso según la presente invención. Varios CPP basados en el TAT se describen en el documento US 5.656.122. Un ejemplo de péptido TAT del VIH según se usa en los siguientes Ejemplos es RKKRRQRRR (SEQ ID. n° 71), pero se aprecia fácilmente que pueden usarse fragmentos del TAT más largos o más cortos.

Como se ha mencionado anteriormente, ninguna característica estructural ni motivo de secuencia son comunes en todos los CPP. Sin embargo, varias clases de CPP pueden ser identificadas por unas características en particular, tales como, por ejemplo, los péptidos que son anfipáticos y tienen una carga positiva neta. Otros grupos de CPP pueden tener una estructura que muestra un elevado contenido en hélices α . Otro grupo pueden ser los péptidos caracterizados por un elevado contenido en aminoácidos básicos. Por lo tanto, los CPP pueden ser o pueden comprender oligómeros de aminoácidos básicos tales como arginina, por ejemplo, de 5 a 20, de 6 a 15 o de 6 a 12 residuos R, por ejemplo, R₇ (SEQ ID NO: 70), R₈ (SEQ ID NO: 72) o R₁₁ (SEQ ID NO: 73) o QSR₈ (SEQ ID NO: 74).

Los péptidos anfipáticos ricos en prolina son otra clase de CPP, y dichos péptidos que se caracterizan por la presencia de anillos de pirrolidina de prolinas se describen en Pujals *et al.* 2008 Advanced Drug Delivery Reviews 60, páginas 473-484.

Otros CPP desarrollados con éxito incluyen pVEC (Elmqvist *et al.* 2003 Biol. Chem 384, páginas 387-393; Holm *et al.* 2005 Febs Lett. 579, páginas 5217-5222) y péptidos derivados de la calcitonina (Krauss *et al.* 2004 Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, páginas 51-54).

Algunos CPP disponibles comercialmente incluyen Chariot, basado en el péptido Pep-1 (Active Motif, Francia), los vectores Syn-B basados en el péptido de la protegrina PG-1 (Syntem, Francia), y Express-si Delivery basado en el péptido MPG de Genospectra, Estados Unidos.

Además de los CPP notificados y disponibles para el público, pueden diseñarse y sintetizarse nuevos péptidos CPP o derivados basándose en criterios conocidos o notificados (por ejemplo, secuencias o características conocidas de los CPP tales como el contenido en aminoácidos básicos, el contenido en hélices α , etc., como se ha analizado anteriormente). Adicionalmente, pueden cribarse péptidos diseñados aleatoriamente u otros para comprobar su actividad CPP, por ejemplo, acoplando o uniendo dicho péptido, por ejemplo, un marcador o una etiqueta detectable que contiene una molécula indicadora, tal como una etiqueta fluorescente, a la carga deseada (un compuesto oligopeptídico desvelado en el presente documento), y ensayar para ver si la construcción es translocada a través de la membrana celular, por ejemplo, mediante la adición de estos péptidos a células vivas, seguido de un análisis de la importación celular, por ejemplo, usando microscopía confocal.

De hecho, aunque generalmente es el caso de que un CPP penetrará o entrará en prácticamente cualquier tipo de célula, en algunos casos puede observarse que una administración con éxito o eficaz puede depender de, o variar según, la naturaleza precisa de la carga (por ejemplo, la secuencia peptídica de la carga) y/o del CPP usado. Entrará ampliamente en la pericia rutinaria de la persona experta en la materia la determinación de las secuencias y de las combinaciones peptídicas óptimas, etc., y ensayar y/o modificar la carga y/o la secuencia o la estructura del CPP, etc.

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos oligopeptídicos (o construcciones) para su uso de la invención pueden comprender además un péptido de señalización que dirige el compuesto (o construcción) dentro de un compartimento subcelular y, en particular, dentro del núcleo. Las secuencias de señalización de localización nuclear (NLS) son de nuevo bien conocidas en la materia y están ampliamente descritas en la bibliografía y puede usarse cualquier NLS conocida o funcional.

Una NLS puede variar en su longitud y/o secuencia, y se ha descrito una amplia variedad de secuencias específicas de NLS. En general, sin embargo, se ha averiguado que los péptidos que comprenden aminoácidos con carga positiva (particularmente lisina (K), arginina (R) y/o histidina (H)) pueden funcionar como una NLS. Un ejemplo de una NLS puede ser, por lo tanto, un péptido, por ejemplo, de 4-20, más particularmente de 4-15, de 4-12, de 4-10 o de 4-8 aminoácidos, en el que al menos 4 aminoácidos (y más particularmente al menos el 60, el 70, el 75, el 80, el 85 o el 90 % de los residuos de aminoácido del péptido NLS) son aminoácidos con carga positiva, seleccionados preferentemente entre K, R o H. Dicho ejemplo de NLS puede tener o comprender, por ejemplo, la secuencia RKRH (SEQ ID NO: 75).

Las señales de localización nuclear, incluyendo tanto las secuencias de NLS reales determinadas experimentalmente como las predichas o propuestas, y las estrategias para la identificación de las NLS, se describen en Lange et al., J. Biol. Chem. 2007, 282(8), 5101-5105; en Makkerh et al., Current Biology 1996, 6 (8), 1025-1027; en Leslie et al., Methods 2006, 39, 291-308; y en Lusk et al. Nature Reviews MCB 2007, 8, 414-420.

Una NLS clásica consiste en uno (monopartita) o dos (bipartita) tramos de aminoácidos básicos. Una NLS monopartita puede estar ejemplificada por la NLS del antígeno T grande del SV40 (¹²⁶PKKKRKV¹³² [SEQ ID NO: 76]) y una NLS bipartita por la NLS de la nucleoplasmina (¹⁵⁵KRPAATKEAGQAKKKK¹⁷⁰ [SEQ ID NO: 77]). Se ha propuesto la secuencia consenso de la NLS monopartita K-[K/R]-X-[K/R] (SEQ ID NO: 78) y en consecuencia una NLS según la presente invención en una realización puede comprender o consistir en una de dicha secuencia consenso (en la que X es cualquier aminoácido).

Una NLS bipartita representativa según la invención puede tener la secuencia KR-[X]₅₋₂₀-KKKK (SEQ ID NO: 79), por ejemplo, KR-X₁₀-KKKK (SEQ ID NO: 80) (en la que X es cualquier aminoácido).

Un ejemplo de NLS bipartita alternativa puede tomar la forma de RKRH-[X]₂₋₁₀-KK (SEQ ID NO: 81), por ejemplo, RKRH-X₂-KK (SEQ ID NO: 82), por ejemplo, RKRH-II-KK (SEQ ID NO: 83).

La NLS de la oncoproteína c-myc difiere de las NLS clásicas en que únicamente 3 de los 9 residuos de aminoácidos son básicos (PAAKRVKLD [SEQ ID NO: 84]), lo que indica que no es necesario que una NLS se ajuste a las secuencias consenso o clásicas dadas anteriormente. Makkerh *et al* (*supra*) describen secuencias de NLS en las que un agrupamiento de aminoácidos básicos (por ejemplo, KKKK [SEQ ID NO: 85]) está flanqueado por residuos neutros y ácidos, por ejemplo, PAAKKKKLD (SEQ ID NO: 86).

Otras posibles secuencias NLS que pueden darse a modo de ejemplo incluyen: PKKKRKVL (SEQ ID NO: 87), KKKRK (SEQ ID NO: 88), KKKRVK (SEQ ID NO: 89), KKKRKVL (SEQ ID NO: 90) y RKKRKVL (SEQ ID NO: 91). Puede usarse cualquier NLS que sea un derivado de una NLS conocida, por ejemplo, la NLS de SV40, nucleoplasmina, UNG2 o c-myc.

Una secuencia NLS probable, propuesta o predicha, puede ser ensayada para comprobar su actividad NLS usando los principios y los ensayos conocidos y descritos en la materia. Por ejemplo, puede unirse una secuencia NLS candidata a la carga deseada (en este caso, un oligopéptido según la invención según se define en el presente documento) y a la construcción puede proporcionarse una molécula indicadora (por ejemplo, una etiqueta o un marcador que puede ser visualizado, por ejemplo, un marcador fluorescente) y ponerse en contacto con una célula de prueba. A continuación puede determinarse la distribución de la construcción en la célula.

Por lo tanto, como resumen, la persona experta será consciente de las secuencias de señalización adecuadas, pero a modo de ejemplo se mencionan las siguientes en el presente documento. Algunos ejemplos de secuencias peptídicas de penetración en la célula incluyen Penetratin™, un péptido de 16 aminoácidos correspondiente a la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia, etiquetas ricas en R tales como R6-Penetratin (en las que se añadieron residuos de arginina al N terminal del Penetratin) y derivados de la proteína Tat del VIH tales como GRKKRRQRRRPPQQ (SEQ ID NO: 92). Algunos ejemplos de secuencias de localización nuclear incluyen el derivado de la proteína del SV40 KKKRK (SEQ ID NO: 93).

Una construcción preferida para su uso según la presente invención comprende (i) un compuesto oligopeptídico que comprende un motivo APIM como se expone en SEQ ID NO: 28, (ii) una señal de localización nuclear y (iii) una secuencia de señalización de penetración en la célula que comprende un oligómero de 5 a 20 aminoácidos básicos.

Los elementos o los componentes individuales de una construcción según la presente invención pueden estar contenidos o presentados en cualquier orden, pero preferentemente en los órdenes indicados anteriormente (por ejemplo, compuesto oligopeptídico APIM-CPP; compuesto oligopeptídico APIM-NLS-CPP).

Adicionalmente, un compuesto oligopeptídico o una construcción para su uso en la invención puede contener más de un motivo de interacción con el PCNA. Por lo tanto, puesto como alternativa, una construcción para su uso según la presente invención puede contener más de un compuesto oligopeptídico que comprende un motivo de interacción con el PCNA. Una construcción o un compuesto oligopeptídico puede contener, por ejemplo, 1-10, por ejemplo, 1-6, o 1-4 o 1-3 o uno o dos motivos. Dichos motivos pueden estar separados o ubicados según se elija, por ejemplo, pueden estar agrupados entre sí, o pueden estar separados por elementos de la secuencia de señalización, por ejemplo, motivo-NLS-motivo-CPP; o motivo-NLS-motivo-motivo- CPP; o motivo-motivo-NLS-CPP, etc.

Los componentes o los elementos de una construcción para su uso según la invención pueden ser unidos o conectados entre sí de cualquier forma deseada o conveniente según las técnicas bien conocidas en la materia. Por lo tanto, los componentes por las partes individuales pueden ser conectados o conjugados químicamente, por ejemplo, usando tecnologías de acoplamiento químico conocidas, o las construcciones pueden formarse en forma de un único todo usando técnicas de ingeniería genética, por ejemplo, técnicas para la formación de proteínas de fusión, o simplemente pueden ser sintetizados como un todo, por ejemplo, usando técnicas de síntesis de péptidos.

Las partes o los componentes individuales pueden ser conectados directamente entre sí, o pueden ser conectados indirectamente por medio de una o más secuencias conectoras (o separadoras). Por lo tanto, una secuencia conectora puede intermediar o separar dos o más partes individuales de una construcción o elementos de motivo individuales en una construcción oligopeptídica. La naturaleza precisa de la secuencia conectora no es crítica y puede tener una longitud y/o una secuencia variable, por ejemplo, puede tener 0-40, más particularmente 0-20, 0-15, 0-12, 0-10, 0-8, o 0-6, 0-4 o 0-3 residuos, por ejemplo, 1, 2 o 3 o más residuos. A modo de ejemplo representativo, la secuencia, si está presente, puede tener 1-15, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6 o 1-4 residuos, etc. La naturaleza de los residuos no es crítica, y pueden ser, por ejemplo, cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido neutro, o un aminoácido alifático, o como alternativa puede ser hidrófobo, o polar o cargado o formador de estructuras, por ejemplo, prolina. Se ha demostrado que un amplio abanico de diferentes secuencias conectoras es de utilidad, incluyendo secuencias cortas (por ejemplo, de 1-6) de aminoácidos neutros y/o alifáticos.

Por lo tanto, algunos ejemplos de secuencias conectoras incluyen cualquier residuo de aminoácido individual, por ejemplo, A, I, L, V, G, R, Q, T o W, o un di-, tri- tetra- penta- o hexapéptido formado por dichos residuos.

Como conectores representativos pueden mencionarse I, II, IL, R, W, WW, WWW, RIL, RIW, GAQ, GAW, VAT, IILVI (SEQ ID NO: 94), IILVIII (SEQ ID NO: 95), etc.

Los conectores entre los diferentes elementos pueden ser iguales o diferentes.

Los compuestos representativos (o más particularmente construcciones) para su uso en la invención incluyen MDRWLKGAWKKKRVKIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 99), MDRWLKGAWKKKRIIRKKRRQRRRG (SEQ ID NO: 100), MDRWLKGAWKKKRIIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 101), MDRWLKRIWKKKRIIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 102), MDRWLKWWWKKKRIIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 103), MDRWLKWWKRHIKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 104), MDRWLKRIWKKKRIIRRRRRRRRRRK (SEQ ID NO: 105), MDRWLKRIWKKKRIIRQIKIWFQNRMMKWKK (SEQ ID NO: 106), MDRFLVKGAWKRHIKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 107), MDRWLKWKKKKIRRRRRRRRRRK (SEQ ID NO: 108), MDRWLKWKKKKIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 109), MDR-WLVKWRKRHIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 110), Ac-MDRWLKGAWRKRHIRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 111), Ac-MDRWLKWKKKKIRRRRRRRRRRK (SEQ ID NO: 112), Ac-MDRALVKWKKKKIRRRRRRRRRRK (SEQ ID NO: 113), Ac-MDRWLKWKKKKIRRRRRRRRRRK (SEQ ID NO: 114), Ac-MDRWLKWKKKKIRRRRRRRRRRK (SEQ ID NO: 115) y MDRWLKRIWKKKRIIRWLKWWWRKKRRQRRRK (SEQ ID NO: 116).

Los compuestos oligopeptídicos que tienen las secuencias según se establecen en las SEQ ID NOS. 98 hasta 117 se

muestran en la Tabla 3 en el siguiente Ejemplo 6, que muestra los componentes individuales que forman las construcciones (es decir, la secuencia que contiene el motivo, el conector, la NLS, el CPP, etc.)

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo. También se desvela en el presente documento el complemento de dicha molécula de ácido nucleico. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia que codifica el péptido como se ha definido anteriormente.

La molécula de ácido nucleico de la invención comprende al menos 15 nucleótidos y preferentemente no más de 800 nucleótidos, más preferentemente no más de 700, de 650, de 600, de 550, de 500, de 450, de 400, de 350, de 300, de 250, de 200, de 150 o de 100 nucleótidos. La molécula de ácido nucleico es preferentemente una molécula aislada.

También se desvela un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según se define en el presente documento. El vector también puede contener los elementos adicionales que se encuentran normalmente en un vector, tal como un origen de replicación, un marcador seleccionable tal como de resistencia a un antibiótico, y/o un sitio de clonación múltiple. El vector puede ser además un vector de expresión, y puede comprender elementos adicionales, por ejemplo, elementos de control o reguladores de la transcripción y/o de la traducción para la expresión de las moléculas de ácido nucleico. Dichos elementos de control, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, potenciadores, terminadores, etc. son bien conocidos y están ampliamente descritos en la materia.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un virus, preferentemente se selecciona entre un retrovirus, un adenovirus y un virus adenoasociado.

En el presente documento también se divulga una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico y/o un vector como se ha descrito anteriormente. La célula hospedadora es una célula animal, preferentemente una célula de mamífero, lo más preferentemente una célula de rata, murina o humana.

Por "recombinante" se entiende que la molécula de ácido nucleico y/o el vector han sido introducidos en la célula hospedadora. La célula hospedadora puede contener o no de forma natural una copia endógena de la molécula de ácido nucleico, pero es recombinante porque se ha introducido una copia exógena o una copia endógena adicional de la molécula de ácido nucleico y/o del vector.

En un aspecto adicional, el compuesto oligopeptídico para su uso como se define en el presente documento o una molécula de ácido nucleico para su uso como se define en el presente documento (por ejemplo, un vector como se define en el presente documento) se proporciona en una composición farmacéutica, junto con un excipiente farmacológicamente (o farmacéuticamente) aceptable.

El excipiente puede incluir cualquier excipiente conocido en la materia, por ejemplo, cualquier portador o diluyente o cualquier otro ingrediente o agente tal como un tampón, un antioxidante, un quelante, un aglutinante, un recubrimiento, un disgregante, un relleno, un aroma, un color, un deslizante, un lubricante, un conservante, un absorbente y/o un edulcorante, etc.

El excipiente puede seleccionarse, por ejemplo, entre ácido láctico, dextrosa, metabisulfato de sodio, alcohol bencílico, polietilenglicol, propilenglicol, celulosa microcristalina, lactosa, almidón, quitosano, almidón pregelatinizado, carbonato de calcio, sulfato de calcio, dextratos, dextrina, dextrosa, fosfato de calcio dibásico dihidratado, fosfato de calcio tribásico, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltodextrina, manitol, celulosa en polvo, cloruro de sodio, sorbitol y/o talco.

La composición farmacéutica puede proporcionarse en cualquier forma conocida en la materia, por ejemplo, en forma de un comprimido, una cápsula, un comprimido recubierto, un líquido, una suspensión, una tableta, un sobrecillo, un implante, un inhalador, un polvo, una pella, una emulsión, un liofilizado, un efervescente, un aerosol, una pomada, una emulsión, un bálsamo, un emplasto o cualquier mezcla de los mismos. Puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de una preparación resistente a los fluidos gástricos y/o en una forma de acción sostenida. Puede ser una forma adecuada para una administración oral, parenteral, tópica, rectal, genital, subcutánea, transuretral, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intramuscular y/o intravenosa, y/o para una administración por inhalación.

En una realización representativa, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para su administración liposomal, por lo que preferentemente se proporcionan liposomas que contienen la composición farmacéutica. Cuando se usan liposomas, puede no ser necesario incluir un excipiente adicional, por lo que en el presente documento también se proporcionan liposomas que contienen un compuesto oligopeptídico según se define en el presente documento, una molécula de ácido nucleico según se define en el presente documento y/o un vector según se define en el presente documento.

Usando una búsqueda en bases de datos, los inventores descubrieron la presencia del nuevo motivo de unión al PCNA en más de otras 200 proteínas, muchas de las cuales están implicadas en la reparación del ADN, el mantenimiento y la regulación del ciclo celular, por ejemplo, la transcripción, la replicación, la fosforilación, la ubiquitinilación, la síntesis de translesión, la cohesión de cromátidas hermanas y la regulación del ciclo celular (véase el Tabla 1 y Ejemplo 4). Estas proteínas incluyen las siguientes:

- una proteína de función desconocida que contiene el dominio I N terminal conservado, que se encuentra en el factor de elongación TFIIIS, una importante proteína para la progresión de la transcripción detenida, de forma que los inventores la denominaron proteína similar al TFIIIS. Esta proteína contiene el motivo en sus 7 aminoácidos N terminales.
- el factor de transcripción multifuncional TFII-I, que es crítico para el control del ciclo celular y la proliferación. Las células que sobreexpresan el TFII-I tienen un aumento en la persistencia de focos de γ -H2AX (un marcador de la ruptura de la doble hélice de ADN), lo que sugiere un papel del TFII-I en la reparación del ADN. Esta proteína contiene 4 de los motivos.
- la topoisomerasa de ADN II alfa (Topo II α), que funciona en la descatenación post-replicativa del ADN y en la segregación del ADN. Esta proteína contiene un motivo.
- la proteína reparadora por escisión del nucleótido clave XPA que reconoce giros de hélices. Esta proteína contiene un motivo.
- RAD51B, una proteína de recombinación homóloga que ha demostrado ser importante para la adecuada función del centrosoma y la segregación del cromosoma. Esta proteína contiene un motivo.
- la proteína del complejo nuclear de la anemia de Fanconi, FANCC. Se ha demostrado que el complejo nuclear de la FA está implicado en la ruta de señalización activada por los daños en el ADN que regula la reparación del ADN de los agentes de reticulación. Esta proteína contiene un motivo.

Algunas proteínas adicionales que se ha averiguado que contienen al menos un motivo están recogidas en la Tabla 1.

Sin desear estar ligados a la teoría, los hallazgos de los inventores indican que mediante la prevención de la interacción del PCNA con al menos uno de sus compañeros habituales, las células pueden ser sensibilizadas frente al efecto de los agentes citostáticos. Por lo tanto, el efecto del agente citostático puede ser modulado. Por ejemplo, puede inhibirse la interacción de una proteína de reparación con el PCNA (por ejemplo, la hABH2), inhibiendo así la reparación del ADN, y aumentando como consecuencia el efecto del agente citostático en los daños al ADN.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto oligopeptídico como se define en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento (por ejemplo, un vector como se define en el presente documento), para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo.

Como se ha mencionado anteriormente, un hallazgo sorprendente que ha conducido a esta invención es que el efecto de un conjunto de diferentes fármacos citostáticos puede ser mejorado o potenciado mediante el uso de un péptido que tiene un motivo de interacción con el PCNA, para inhibir así la interacción del PCNA con probablemente un amplio abanico de proteínas, por ejemplo, las proteínas implicadas en la reparación del ADN y en la replicación y la progresión del ciclo celular, etc. Esto da lugar a la propuesta general de que cualquier molécula que interactúe con el PCNA puede usarse junto con un agente citostático, con objeto de mejorar el efecto de ese agente citostático, o para sensibilizar a las células frente a este efecto.

Consecuentemente, en otro aspecto más, se proporciona un compuesto oligopeptídico capaz de interactuar con el PCNA según se define anteriormente o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho compuesto oligopeptídico, para su uso junto con un agente citostático en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo.

Por lo tanto, en una realización, el medicamento puede comprender adicionalmente un agente citostático.

El medicamento puede estar en forma de una composición individual que comprende tanto el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico como el agente citostático, o puede estar en forma de un kit o de un producto que los contiene para una administración por separado (por ejemplo, simultánea o secuencial).

En otro aspecto, la invención proporciona un producto que contiene un compuesto oligopeptídico capaz de interactuar con el PCNA, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho compuesto oligopeptídico, junto con un agente citostático en forma de una preparación combinada para un uso por separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo.

Los compuestos oligopeptídicos (incluyendo las construcciones) desveladas en el presente documento tienen por lo tanto una utilidad terapéutica en cualquier afección o situación clínica en la que sea deseable (o en la que pueda ser beneficiosa) la inhibición del crecimiento de las células.

El término "inhibir" se usa ampliamente para incluir cualquier reducción o disminución en el crecimiento celular, así como la prevención o la abolición del crecimiento celular. Por lo tanto, una "inhibición" incluye la reducción o la prevención del crecimiento celular. Esto puede ser determinado mediante cualquier medio apropiado o conveniente, tal como la determinación o la evaluación del número de células, del tamaño (por ejemplo, del tamaño del tejido en el que están contenidas las células), de la viabilidad celular y/o de la muerte celular, etc., según puede determinarse mediante técnicas bien conocidas en la materia.

El "crecimiento" de las células según se indica en el presente documento, también se usa ampliamente para incluir cualquier aspecto del crecimiento celular, incluyendo, en particular, la proliferación de las células.

Los compuestos oligopeptídicos desvelados en el presente documento pueden usarse por lo tanto en el tratamiento de cualquier afección (que se usa ampliamente en el presente documento para incluir cualquier trastorno o cualquier situación clínica) que sea sensible a una reducción en el crecimiento celular (particularmente en la proliferación celular). Los compuestos oligopeptídicos desvelados en el presente documento hallan consecuentemente utilidad en cualquier terapia (o tratamiento) que se dirija al crecimiento (o la proliferación) celular. En otras palabras, los compuestos pueden usarse en cualquier aplicación terapéutica en la que sea deseable o ventajoso inhibir la proliferación celular.

El término "tratamiento" según se usa en el presente documento se refiere ampliamente a cualquier efecto o etapa (o intervención) beneficioso en la gestión de una afección clínica, y por lo tanto incluye tratamientos tanto terapéuticos como profilácticos. Un tratamiento puede incluir la reducción, el alivio, la mejora, la ralentización del desarrollo o la eliminación de la afección o de uno o más de los síntomas de la misma, que está siendo tratada, con respecto a la afección o el síntoma antes del tratamiento, o de cualquier forma que mejore el estado clínico del sujeto. Un tratamiento puede incluir cualquier etapa clínica o intervención que contribuya o que sea parte de un programa o régimen de tratamiento. Un tratamiento profiláctico puede incluir retrasar, limitar, reducir o prevenir la afección o la aparición de la afección, o uno o más síntomas de la misma, por ejemplo, con respecto a la afección o el síntoma antes del tratamiento profiláctico. La profilaxis puede incluir por lo tanto explícitamente tanto la prevención absoluta de la aparición o el desarrollo de la afección o de un síntoma de la misma, como cualquier retraso en la aparición o el desarrollo de la afección o el síntoma, o una reducción o una limitación en el desarrollo o en la progresión de la afección o el síntoma. El tratamiento según la invención incluye por lo tanto la destrucción, la inhibición o la ralentización del crecimiento de las células, o del aumento del tamaño de una población de células en un cuerpo (por ejemplo, en un tejido, un tumor o el crecimiento), la reducción en el número de células o la prevención de la diseminación de las células (por ejemplo, a otro sitio anatómico), la reducción del tamaño de un crecimiento celular, etc. El término "tratamiento" no implica la curación o la completa anulación o eliminación del crecimiento celular, o un crecimiento de células.

Dado que las aplicaciones terapéuticas y las utilidades de la presente invención pueden implicar generalmente la inhibición de la proliferación celular, cualquier célula en proliferación puede ser el objetivo de las terapias y las utilidades divulgadas en, y englobadas por, el presente documento. Dichas células en proliferación pueden incluir células sanas, enfermas y células de cualquier tejido en el que se produzca una proliferación. Por ejemplo, dichas células pueden incluir, en particular, células neoplásicas, incluyendo células neoplásicas tanto malignas como no malignas, y células del sistema inmunitario (células inmunitarias), células del sistema hematopoyético de forma general, o células de la piel.

Los trastornos o las afecciones que implican un crecimiento celular anormal o indeseado pueden ser tratados con agentes citostáticos, y los agentes citostáticos pueden ser usados en cualquier situación en la que se desea reducir o prevenir el crecimiento y la proliferación celular, incluyendo las situaciones en las que se desea destruir o eliminar las células. Consecuentemente, como una alternativa establecida anteriormente, los compuestos oligopeptídicos (incluyendo las construcciones) desveladas en el presente documento pueden usarse en cualquier tratamiento que implique (o que incluya) el uso de un agente citostático. Estos pueden incluir el tratamiento de cualquier afección sensible a un agente citostático o de cualquier afección que pueda ser tratada con, o que requiera el uso de, un agente citostático.

El tratamiento de trastornos hiperproliferativos representa un aspecto de particular interés. El término "trastorno hiperproliferativo" se usa ampliamente en el presente documento para incluir cualquier trastorno o afección que implique un aumento, indeseado o no deseado, en la proliferación de células. Por lo tanto, se incluyen no solamente las afecciones en las que está aumentada la proliferación de las células, por ejemplo, con respecto a las células normales o sanas, o a las células en ausencia de la afección en cuestión (por ejemplo, en comparación o con respecto a un sujeto sano o de control, o en comparación o con respecto a las células tomadas de un tejido sano o no afectado del mismo sujeto), sino también las afecciones en las que la proliferación celular no está aumentada (o no está aumentada en gran medida o significativamente) con respecto a lo normal, pero en las que la proliferación que se produce no es deseada o es indeseada, tanto de forma general como en un contexto en particular. Esto puede incluir,

por ejemplo, una proliferación de células no deseada o indeseada que puede producirse en una respuesta "normal", por ejemplo, una respuesta inmunitaria o una respuesta inflamatoria, etc. (en otras palabras, una respuesta "normal" que puede producirse en un contexto en particular (por ejemplo, normal), pero que, no obstante, puede ser no deseada). Dicha respuesta proliferativa no deseada puede ser, por ejemplo, la proliferación de células que da como resultado una respuesta inflamatoria no deseada, o una respuesta inmunitaria no deseada tal como una respuesta autoinmune o una reacción alérgica, etc.

Los trastornos hiperproliferativos que pueden ser tratados según la presente invención incluyen por lo tanto explícitamente la inflamación (más particularmente, trastornos o afecciones inflamatorias, o afecciones que implican, o que están asociadas con, o caracterizadas por, una inflamación) y trastornos o afecciones autoinmunes, o trastornos o afecciones que tienen un componente autoinmune.

Un trastorno hiperproliferativo puede implicar (pero no se limita a) la proliferación de células que tienen la capacidad de un crecimiento autónomo, es decir, células que existen y se reproducen independientemente de los mecanismos reguladores normales. Un trastorno hiperproliferativo puede ser, por lo tanto, un trastorno neoplásico, y como se ha indicado anteriormente, éste puede ser un trastorno maligno o no maligno.

Las células hiperproliferativas pueden clasificarse como patológicas (es decir, que se desvían de las células normales y están asociadas con un estado patológico) o no patológicas (es decir, que se desvían de lo normal pero están asociadas con un estado patológico).

Las células hiperproliferativas patológicas pueden estar asociadas con, o ser características de, los siguientes estados patológicos o trastornos: reestenosis, nefropatía diabética, hiperplasia tiroidea, enfermedad de Graves, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, síndrome de Li-Fraumeni y cánceres (incluyendo cualquier tumor o neoplasia).

Algunos ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen las células epiteliales del conducto mamario durante el desarrollo de la lactancia, y también las células asociadas con la reparación de heridas.

Los compuestos desvelados en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de dichos trastornos y enfermedades, y de otros, incluyendo la retinopatía diabética y las enfermedades vasculares periféricas.

Los trastornos hiperproliferativos pueden ser, como se ha indicado anteriormente, trastornos neoplásicos malignos o no malignos. También están incluidos los trastornos premalignos y no neoplásicos. Algunos ejemplos de trastornos hiperproliferativos premalignos o no neoplásicos o no malignos incluyen trastornos mielodisplásicos, carcinoma cervical *in situ*, poliposis intestinal familiar (por ejemplo, el síndrome de Gardner), leucoplasias orales, histiocitosis, queloides, hemangiomas, estenosis arterial hiperproliferativa, artritis inflamatoria, hiperqueratosis y erupciones papuloescamosas, incluyendo artritis. También están incluidas las enfermedades hiperproliferativas inducidas por virus, tales como las verrugas y la enfermedad inducida por el EBV (por ejemplo, mononucleosis infecciosa), la formación de cicatrices y similares.

El trastorno hiperproliferativo puede ser por lo tanto cualquier trastorno hiperproliferativo, por ejemplo, seleccionado entre trastornos neoplásicos tales como el cáncer, la artritis psoriática, la artritis reumatoide, los trastornos hiperproliferativos gástricos tales como la enfermedad inflamatoria del intestino, los trastornos de la piel incluyendo la psoriasis, el síndrome de Reiter, la pitiriasis rubra pilaris y las variantes hiperproliferativas de los trastornos de queratinización.

El cáncer representa un trastorno hiperproliferativo de particular interés, y están incluidos todos los tipos de cánceres, incluyendo, por ejemplo, tumores sólidos y cánceres hematológicos. Algunos tipos representativos de cáncer incluyen cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma epidermoide, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda y leucemia mielógena crónica), cáncer cerebral (por ejemplo, astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma), neuroblastoma, sarcomas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de estómago, cáncer anal, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, plasmacitoma, linfomas, retinoblastoma, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, melanoma y otros cánceres cutáneos.

También pueden mencionarse tumores sinusales, cáncer de uretra y genitourinario, cáncer de esófago, mieloma, cánceres endocrinos, osteosarcoma, angiosarcoma y fibrosarcoma, y cualquier tumor del sistema nervioso central o periférico, maligno o benigno, incluyendo gliomas y neuroblastomas.

Los trastornos o las enfermedades autoinmunes representan una afección adicional de particular interés, e incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, trastornos inmunitarios tales como lupus eritematoso sistémico (SLE; lupus) o miastenia gravis.

También son de interés, hablando de forma general, los trastornos hematológicos o las enfermedades de la sangre o

de la médula ósea, que no necesitan ser necesariamente malignos o cancerosos (por ejemplo, varias discrasias, o displasias, hiperplasias no malignas, agranuloma o MGUS (Gammopatía Monoclonal de Significación Desconocida). Por lo tanto, cualquier afección que implique una proliferación no deseada, o indeseada o anormal de células sanguíneas o de la médula ósea, o de sus precursores, puede ser tratada según la presente invención.

Otras afecciones que pueden mencionarse incluyen particularmente la meningitis neoplásica y las enfermedades mieloproliferativas, por ejemplo, la policitemia vera (que se produce cuando se producen excesivos glóbulos rojos sanguíneos).

Varias afecciones también pueden aparecer como el resultado de, o estar de otro modo asociadas con, una inflamación o una enfermedad autoinmune. Dichas afecciones también pueden ser tratadas según la presente invención. Puede mencionarse en particular el escleromixedema y la mucinosis papular, la amiloidosis y la granulomatosis de Wegener.

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos para su uso en la invención pueden aumentar o potenciar los efectos de un agente citostático. Consecuentemente, pueden hallar utilidad en cualquier aplicación terapéutica en la que pueda usarse un agente citostático. Estas pueden incluir cualquier situación en la que se desea destruir o eliminar células, que pueden incluir no solo células enfermas. En particular, dicha situación aparece cuando es deseable destruir la médula ósea antes de un trasplante. Los compuestos para su uso en la invención pueden usarse por lo tanto en una mieloablación, y particularmente en la mieloablación que precede a un trasplante, que puede ser, por ejemplo, un trasplante de médula ósea, o de forma más general, un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), (al igual que a partir de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas también pueden obtenerse o derivar de la sangre, por ejemplo, de sangre periférica).

El trasplante de células madre puede usarse en el tratamiento de enfermedades o de afecciones de la sangre o de la médula ósea (es decir, afecciones o trastornos hematológicos), que pueden ser malignos o no malignos, y en algunos otros tipos de cáncer, incluyendo cánceres de tumores sólidos tales como neuroblastoma, cáncer desmoplásico de células pequeñas y redondas, sarcoma de Ewing y coriocarcinoma. Algunas neoplasias hematológicas incluyen leucemias, linfomas (de Hodgkin y no Hodgkin) y mielomas. Algunos trastornos hematológicos no malignos incluyen trastornos de fagocitos (por ejemplo, mielodisplasia), anemias (por ejemplo, aplasia grave o anemia aplásica), y trastornos mieloproliferativos (por ejemplo, policitemia vera y trombocitosis esencial). Otras afecciones adquiridas que pueden ser tratadas mediante un trasplante de células madre incluyen trastornos tales como la amiloidosis, y las enfermedades inducidas por el entorno tales como un envenenamiento por radiación. El trasplante de células madre puede usarse también en el tratamiento de trastornos congénitos, incluyendo varios trastornos lisosomales, inmunodeficiencias y algunos trastornos hematológicos no malignos, por ejemplo, anemias, citopenias, síndromes hemofagocíticos, hemoglobinopatías, anemia falciforme y talasemia β mayor.

La radioterapia (conocida también como terapia de radiación y oncología de radiación) puede usarse en el tratamiento de varias afecciones que incluyen los trastornos hiperproliferativos descritos anteriormente. Por "radioterapia" se entiende el uso de una radiación ionizante que es capaz de dañar el ADN de las células mediante la ionización directa o indirecta de los átomos que forman la cadena de ADN. La ionización indirecta se produce como resultado de la ionización del agua, la formación de radicales libres, especialmente de radicales hidroxilo, que a continuación dañan el ADN. En las formas más habituales de radioterapia, la mayor parte del efecto de la radiación es a través de los radicales libres.

La radioterapia es útil en el tratamiento del cáncer y para la eliminación de tejidos patológicos debido a los efectos citotóxicos resultantes de las persistentes rupturas en la doble hebra de ADN o de la activación de la muerte celular programada. La radiación ionizante provoca que las células hiperproliferativas, tales como las células tumorales y cancerosas, experimenten una muerte celular mediante apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Desafortunadamente, la radioterapia a menudo no tiene éxito para erradicar completamente el cáncer de un paciente porque a menudo no es posible administrar una dosis lo suficientemente elevada de radiación local como para destruir las células tumorales sin un riesgo inaceptablemente elevado de dañar el tejido normal circundante. También se sabe que las células muestran unas susceptibilidades muy variables a la muerte celular inducida por radiación, y la radiación ionizante también puede activar un mecanismo de respuesta a favor de la supervivencia a través de las rutas de transmisión de señales de la 3-cinasa de fosfatidilinositol/Akt (PI3K/Akt) y de la cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK). Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar la eficacia de la radioterapia mediante la sensibilización de las células frente a los efectos de la radiación ionizante.

Consecuentemente, los compuestos para su uso en la invención pueden usarse para proporcionar dicho efecto sensibilizante, en otras palabras, para mejorar (o dicho alternativamente, para aumentar o potenciar) los efectos de la radioterapia, o para hacer que un sujeto (o más particularmente células, que pueden estar presentes en un sujeto) sea más susceptible a los efectos de la radioterapia. Por lo tanto, pueden hallar utilidad en cualquier aplicación terapéutica en la que se use radioterapia. Estas pueden incluir cualquier situación en la que se desee destruir o eliminar células, que pueden incluir no solo células enfermas.

Los compuestos para su uso en la invención pueden usarse por lo tanto como sensibilizadores de las células frente a

los efectos dañinos en el ADN de la radiación ionizante. Por "sensibilizar" se entiende el uso de los compuestos de la invención para mejorar el efecto de daño en el ADN de la radiación ionizante en las células. Esto puede conseguirse mediante la inhibición de los mecanismos celulares endógenos de reparación del ADN.

Por lo tanto, la presente invención engloba un compuesto oligopeptídico que comprende un motivo de interacción con PCNA según se define en el presente documento, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho motivo de interacción con PCNA, para su uso junto con radioterapia, en el que el compuesto es administrado por separado, simultáneamente o secuencialmente con la radioterapia. La radioterapia, junto con el compuesto, puede ser administrada en el tratamiento de cualquier afección que sea sensible a, o que requiera, una radioterapia. Los compuestos o las construcciones de la invención pueden usarse por lo tanto en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo.

La invención contempla todos los tipos de radioterapia, incluyendo, pero no se limitan a, radioterapia de haz externo convencional, radioterapia estereotáctica, simulación virtual, radioterapia conformal tridimensional, radioterapia de intensidad modulada y terapia con radioisótopos (RIT).

Por lo tanto, en una realización preferida de cualquiera de los aspectos recogidos en el presente documento, el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector) según se define en el presente documento se usan junto con (simultáneamente, por separado o secuencialmente) una radioterapia.

En una realización preferida adicional de cualquiera de los aspectos recogidos en el presente documento, el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector) según se define en el presente documento reivindicaciones anexas se usan junto con (simultáneamente, por separado o secuencialmente) un agente citostático.

Por "agente citostático" se entiende un agente que es capaz de inhibir o de suprimir el crecimiento y/o la multiplicación (replicación/proliferación) de las células animales.

Como agentes citostáticos se incluyen los agentes citotóxicos, los agentes antineoplásicos y cualquier agente que pueda estar indicado en una aplicación oncológica o hematológica. Por lo tanto, están incluidos los agentes usados en los protocolos de tratamiento quimioterapéutico ("agentes quimioterapéuticos").

Los agentes citostáticos se agrupan normalmente en diferentes clases según su mecanismo de acción, y todas estas clases están contempladas en el presente documento. Por lo tanto, el agente citostático puede ser un agente alquilante, un agente de reticulación, un agente intercalante, un análogo de nucleótido, un inhibidor de la formación del huso y/o un inhibidor de la topoisomerasa I y/o II. Otros tipos de clases de agentes incluyen antimetabolitos, alcaloides y terpenoides vegetales o un antibiótico antitumoral. Preferiblemente, es un agente alquilante.

Los agentes alquilantes modifican el ADN mediante la alquilación de los nucleósidos, lo que da lugar a la prevención de una correcta replicación del ADN. Los análogos de nucleótidos quedan incorporados en el ADN durante la replicación e inhiben la síntesis del ADN. Los inhibidores de la formación del huso alteran la formación del huso, dando lugar a la detención de la mitosis durante la metafase. Los agentes intercalantes se intercalan entre las bases del ADN, inhibiendo así la síntesis del ADN. Los inhibidores de la topoisomerasa I o II afectan a la torsión del ADN, interfiriendo así en la replicación del ADN.

Los agentes citostáticos adecuados son conocidos en la materia, pero a modo de ejemplo, en el presente documento se mencionan actinomicina D, BCNU (carmustina), carboplatino, CCNU, campotecina (CPT), cantaridina, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, DTIC, epirubicina, etopósido, gefinitib, gemcitabina, ifosamida, irinotecan, ionomicina, melfalano, metotrexato, mitomicina C (MMC), mitozantronmercaptapurina, oxaliplatino, paclitaxel (taxol), inhibidor de la PARP-1, taxotere, temozolomida (TZM), tenipósido, topotecan, treosulfano, vinorelbina, vincristina, vinblastina, 5-azacitidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina y 5-fluorouracilo. La persona experta estará al tanto de los intervalos de dosificación adecuados para cualquier agente citostático dado, y en una realización, el agente citostático está presente en la composición farmacéutica, o es administrado al sujeto, en un intervalo de dosis típico. En una realización ventajosa, puede haber presente/usarse una dosis menor del agente citostático, debido a que el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector) sensibiliza a las células frente a los agentes citostáticos, y por lo tanto, cuando se usa junto con el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector), una menor dosis del agente citostático tendrá un efecto terapéutico igual o comparable al de una dosis mayor del agente citostático por sí mismo. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector) hace por lo tanto posible el tratamiento de sujetos que tienen una tolerancia baja, o inferior a la media, frente a los agentes citostáticos, tales como los ancianos, los bebés o los niños, o las personas debilitadas, por ejemplo, debido a una enfermedad, por malnutrición y similares.

Un problema que se encuentra cuando se usan agentes citostáticos para el tratamiento de un trastorno

hiperproliferativo es que normalmente no se destruyen todas las células afectadas. Se contempla que cuando se usan conjuntamente un agente citostático y el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector), se destruye un mayor porcentaje de células afectadas, y en una realización, se usa una dosis mayor de la habitual del agente citostático junto con el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector), para conseguir la destrucción de una proporción muy alta de las células patológicas, por ejemplo, de al menos el 50, el 60 el 70 o el 80 %, preferentemente de al menos el 85, el 90 o el 95 %, lo más preferentemente para destruir sustancialmente todas las células patológicas.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector) según se define en el presente documento se usa en conjunto con un agente citostático, entonces puede haber presentes dos agentes diferentes en la misma composición farmacéutica, o pueden ser administrados por separado. La administración por separado puede incluir una administración sustancialmente al mismo tiempo pero a través de vías de administración diferentes, o mediante una administración en ubicaciones diferentes. La administración por separado también puede incluir una administración en momentos diferentes, por ejemplo, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 12 horas de diferencia.

El sujeto es un animal (es decir, cualquier ser humano o un animal no humano), preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano.

La persona experta estará al tanto de los métodos adecuados para la introducción del compuesto oligopeptídico o de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector), en las células. A modo de ejemplo, a continuación se analizan brevemente unos pocos métodos adecuados. La microencapsulación proporciona una forma simple y rentable de encerrar materiales bioactivos en una membrana polimérica semipermeable con el fin de proteger los materiales bioactivos y liberar las sustancias encerradas o sus productos de una forma controlada. En la internalización fotoquímica (PCI), tanto la molécula de interés como el compuesto fotosensibilizante son captados por la célula en un lisosoma o un endosoma. Después, las células son expuestas a una luz con una longitud de onda adecuada para activar el compuesto fotosensibilizante, provocando que el compuesto fotosensibilizante altere la membrana del lisosoma o del endosoma, liberando así la molécula de interés en el citosol de la célula.

Otros métodos incluyen microinyección, fusión mediada por glóbulos rojos fantasma, fusión de liposomas, lisis osmótica de pinosomas, carga de raspaduras, electroporación, transfección mediada por fosfato de calcio y virus, y el uso de portadores copoliméricos.

El quitosano y los derivados solubles en agua del quitosano, en particular el glicol quitosano, están surgiendo como los portadores farmacológicos de elección debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad *in vivo*. Un ejemplo preferido es el glicol quitosano modificado hidrófobamente con ácido 5 β -colánico.

En el presente documento se usa el código habitual de aminoácidos, por lo que K representa lisina (Lys), I representa isoleucina (Ile), y así sucesivamente.

El compuesto oligopeptídico para su uso en la invención puede incorporar uno o más, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos que poseen una cadena lateral que no está codificada por el código genético habitual, denominados en el presente documento "aminoácidos no codificados". Estos pueden seleccionarse entre los aminoácidos que se forman a través de los procesos metabólicos, tales como la ornitina o la taurina, y/o los aminoácidos modificados artificialmente, tales como los aminoácidos protegidos con 9H-fluoren-9-ilmetoxycarbonilo (Fmoc), (terc)-(B)util (o)xi (c)arbonilo (Boc), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc), o los aminoácidos que tienen el grupo benciloxycarbonilo (Z). Cuando están presentes dichos aminoácidos no codificados, no están ubicados en el motivo.

La estabilidad *in vitro* y/o *in vivo* del compuesto oligopeptídico para su uso en la invención puede mejorarse o aumentarse a través del uso de los medios estabilizantes o protectores conocidos en la materia, por ejemplo, la adición de grupos protectores o estabilizantes, la incorporación de derivados o de análogos de aminoácidos, o la modificación química de aminoácidos. Dichos grupos protectores o estabilizantes pueden estar unidos, por ejemplo, en el N y/o en el C terminal. Un ejemplo de dicho grupo es un grupo acetilo, y otros grupos protectores o grupos que podrían estabilizar un péptido son conocidos en la materia.

Los compuestos oligopeptídicos para su uso en la invención comprenderán normalmente únicamente los aminoácidos que tienen la configuración L, pero puede haber presentes uno o más aminoácidos que tengan la configuración D. Preferiblemente, el compuesto oligopeptídico contiene al menos 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos D, y preferentemente se encuentran en el motivo, pero en otra realización, los aminoácidos D están presentes únicamente fuera del motivo. El compuesto oligopeptídico puede ser lineal o cíclico.

Por "compuesto oligopeptídico" se entiende un compuesto que está formado por aminoácidos o subunidades equivalentes, que están conectados entre sí por enlaces peptídicos o equivalentes. Por lo tanto, el término "compuesto oligopeptídico" incluye péptidos y peptidomiméticos.

Por "subunidad equivalente" se entiende una subunidad que es estructural y funcionalmente similar a un aminoácido.

La fracción de esqueleto de la subunidad puede diferir de un aminoácido habitual, por ejemplo, puede incorporar uno o más átomos de nitrógeno en lugar de uno o más átomos de carbono.

Por "peptidomimético" se entiende un compuesto que es funcionalmente equivalente o similar a un péptido, y que puede adoptar una estructura tridimensional similar a la de su péptido homólogo, pero que no está únicamente formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Una clase preferida de peptidomiméticos son los peptoides, es decir, glicinas sustituidas con *N*. Los peptoides están estrechamente relacionados con sus péptidos homólogos naturales, pero difieren químicamente en que sus cadenas laterales están unidas a los átomos de nitrógeno a lo largo del esqueleto de la molécula, en lugar de a los carbonos α , como lo están en los aminoácidos.

Al menos el motivo parte del compuesto oligopeptídico comprende únicamente enlaces peptídicos, y está formado únicamente por los aminoácidos codificados. Lo más preferentemente, el compuesto oligopeptídico es un péptido.

El compuesto oligopeptídico puede incorporar di-aminoácidos y/o aminoácidos β , pero al menos la parte del motivo está formada preferentemente únicamente por aminoácidos α . Lo más preferentemente, el compuesto oligopeptídico consiste en aminoácidos α .

El prefijo "oligo" se usa para designar un número relativamente pequeño de subunidades tales como aminoácidos, es decir, menos de 200, preferentemente menos de 100, 90, 80, 70, 60 o 50 subunidades. El compuesto oligopeptídico para su uso en la invención puede comprender por lo tanto al menos 10 y no más de 70 subunidades. Preferentemente, comprende al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 subunidades. Definido de una forma alternativa, no comprende más de 40, 35, 30, 29, 28, 27, 26 o 25 subunidades. Los intervalos subunitarios representativos incluyen por lo tanto 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-12, 5-10, etc., prefiriéndose 5-20 y 5-30.

La naturaleza de las subunidades fuera del motivo no es crítica, de forma que las subunidades fuera del motivo pueden ser, por ejemplo, aquellas que se encuentran en la proteína nativa, tal como la hABH2, o pueden ser residuos de alanina, o cualquier otro residuo adecuado.

Los peptidomiméticos normalmente tienen una semivida más larga en el cuerpo de un paciente, por lo que se prefieren en realizaciones cuando se desea un efecto con una duración más larga. Esto puede ayudar a reducir la frecuencia con la que tiene que ser readministrada la composición. Sin embargo, por razones de bioseguridad, puede preferirse una semivida más corta en otras realizaciones; en esas realizaciones se prefieren péptidos.

El compuesto oligopeptídico puede formar parte de una unidad mayor, por ejemplo, puede estar fusionado con un polipéptido para formar una proteína de fusión recombinante, o unido a un soporte para formar un aptámero peptídico. Por lo tanto, se desvelan en el presente documento las proteínas de fusión o los aptámeros que incorporan el compuesto oligopeptídico de la invención. También se desvelan en el presente documento las composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión o aptámeros y el uso de dichas proteínas de fusión o aptámeros en una terapia, como se ha descrito anteriormente.

Sin desear estar ligados a ninguna teoría, se cree que, para una óptima reparación del ADN, el mantenimiento y/o la regulación del ciclo celular, varias proteínas tienen que interactuar con el PCNA, y que los compuestos oligopeptídicos de la invención son capaces de competir con las proteínas que poseen el motivo consenso para interactuar con el PCNA. Algunos ejemplos de proteínas que pueden tener que interactuar con el PCNA a través del nuevo motivo para una óptima reparación del ADN, el mantenimiento y/o la regulación del ciclo celular, están recogidas en la Tabla 1, de forma que la proteína puede ser una polimerasa de ADN, una ligasa de ADN, una topoisomerasa, una proteína de reparación del ADN, proteínas de reparación del ADN asociadas/de interacción, una proteína implicada en la cohesión de las cromátidas hermanas, el remodelado de la cromatina, la unión del ADN, el procesado de la ubiquitina o el procesado de la SUMO, la ligasa de ubiquitina E3, un factor de transcripción, un regulador del ciclo celular, una cinasa de proteína, una metiltransferasa, una acetiltransferasa, un antígeno asociado al cáncer, una proteína estructural o una cinesina del centrosoma.

Cuando hay presente un nivel suficiente del compuesto oligopeptídico en una célula, entonces la actividad de una o más de estas proteínas se reduce o incluso se anula debido a esta inhibición competitiva.

Se cree que el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el vector según) se definen en el presente documento no tienen actividad enzimática por sí mismos y no son tóxicos para las células (véase el Ejemplo 2). Por lo tanto, se ha demostrado que la expresión de un péptido que comprende un motivo de interacción con el PCNA según se define en el presente documento no tiene ningún efecto, o únicamente efectos menores, sobre el crecimiento de la célula en la que es expresado. Esto puede depender del nivel de expresión. Sin embargo, se cree que en algunas situaciones los compuestos oligopeptídicos pueden ser citotóxicos, y consecuentemente pueden usarse como agentes citotóxicos (o citostáticos) por sí mismos. Por lo tanto, los compuestos pueden usarse como agentes citotóxicos en el tratamiento de afecciones, como se ha analizado en el presente documento, y no necesariamente siempre junto con un agente citostático aparte, o con radioterapia.

Los experimentos han demostrado que los compuestos oligopeptídicos administrados a las células pueden tener un

efecto citotóxico sobre la célula.

El efecto citotóxico puede variar dependiendo de la naturaleza precisa del compuesto, por ejemplo, de su secuencia o su composición. En particular, el efecto citotóxico puede obtenerse con construcciones que comprenden una NLS y/o CPP y se ha observado con construcciones que contienen tanto NLS como CPP. Se ha observado fuerte evidencia de toxicidad con construcciones de localización nuclear.

Más particularmente, adicionalmente se ha observado que puede obtenerse un aumento en el efecto citotóxico con un compuesto o unas construcciones que contengan más de un motivo de unión al PCNA.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras, en los que

La [Figura 1](#) contiene imágenes de microscopía confocal que muestran que la hABH2 y el PCNA se colocan, y que los 10 aminoácidos N terminales de la hABH2 son necesarios y suficientes para esta colocación. Se ensayaron varias construcciones de la hABH2 (la hABH2 completa que tiene los residuos 1-261, la hABH2 truncada que tiene los residuos 11-261 y un fragmento N terminal de la hABH2 que consiste en los residuos 1-10) marcadas con EYFP para evaluar la colocación con el PCNA marcado con ECFP (véase el Ejemplo 1). El carril izquierdo muestra las células transfectadas solo con la hABH2, mientras que los otros tres carriles muestran las células cotransfectadas con una construcción de la hABH2 y el PCNA.

La [Figura 2](#) es una gráfica que muestra los resultados de un análisis de FRET. Se muestran las mediciones normalizadas de la FRET (N_{fret}) entre la EYFP (proteína fluorescente amarilla) / ECFP (proteína fluorescente cian) (carril 1, fondo debido a la dimerización de las etiquetas), el EYFP-PCNA / ECFP-PCNA (carril 2, control positivo debido a que el PCNA se une al PCNA), la hABH2-EYFP / ECFP-PCNA (carril 3) y la hABH2-EYFP de 1-10N / ECFP-PCNA (carril 4).

La [Figura 3](#) contiene unas gráficas que muestran el efecto de varios agentes citostáticos sobre células que expresan la hABH2₁₋₁₀-EYFP, o que expresan la EYFP como control. Los tratamientos se muestran a la izquierda, las células sin tratar a la derecha. Los tratamientos se llevaron a cabo con MMS 10 μM , BCNU 40 μM , MMC 1 μM o TMZ 600 μM durante 4 días (Figuras 3 a-d respectivamente). Los datos presentados son de una representativa de al menos 3 experimentos, se ensayó el crecimiento celular a diferentes dosis en 8 pocillos paralelos.

La [Figura 4](#) muestra una alineación de la secuencia de los 10 aminoácidos N terminales de los homólogos de la ABH2 de *Homo sapiens* (NP 001001655.1), *Bos Taurus* (NP 001019687.1), *Rattus norvegicus* (XP 222273.3), *Mus musculus* (NP 778181.2), *Gallus gallus* (XP 415188.2) y *Strongylocentrotus purpuratus* (XP 797704.1) usando Clustal W. Las secuencias se obtuvieron en una base de datos pública.

La [Figura 5](#) muestra una alineación de las secuencias de las proteínas identificadas en el Ejemplo 4 de varias especies diferentes.

La [Figura 6](#) presenta unas gráficas que muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con varios péptidos según se describe en el Ejemplo 7 (Figura 6 (a) hasta (h)). Se sembraron células HeLa en placas de 96 pocillos (6000 células/pocillo) y se incubaron durante 3 horas. Se añadieron varias dosis de los péptidos a los pocillos en presencia (rombos oscuros) o en ausencia (cuadrado oscuro) de suero en el medio. Después de 1 h se añadió a los pocillos un volumen de medio igual con un 10 % o un 20 % de suero (al medio exento de suero). Las células se incubaron durante 48 horas antes de la medición de la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT. Las gráficas muestran el crecimiento celular (DO a 750 nm) frente a la concentración de péptido (μM).

Ejemplos

Procedimientos experimentales usados en los Ejemplos

Construcciones de expresión

La clonación de las construcciones de expresión con etiqueta fluorescente ECFP-PCNA y hABH2₁₋₂₆₁-EYFP ha sido descrita previamente (Aas et al., 2003). Empleando la hABH2₁₋₂₆₁-EYFP como molde, se generaron la hABH2₁₋₁₀-EYFP y la hABH2₁₁₋₂₆₁-EYFP mediante una PCR. Los amplicones se clonaron en pEYFP-N1 (Clontech) usando *NdeI* / *AgeI* y *AgeI* / *EcoRI* respectivamente. El producto de la PCR de EST (clon de imagen 5176979 (BC035374) RZPD) se clonó en pEYFP-C1 (HindIII / Acc651) para dar EYFP-TFII-SL. La construcción EYFP-XPA se elaboró cambiando la EYFP por la EGFP (fragmento *NheI* / *BsrGI*) en His9-HA-EGFP-XPA (Rademakers et al., 2003) proporcionada generosamente por el Dr. Wim Vermeulen (Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam). La TFII-I-EYFP fue generada mediante una amplificación por PCR del TFII-I de p13CX-TFII-I (Roy et al., 1993) proporcionado generosamente por el Dr. Robert G. Roeder (Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, The Rockefeller University, Nueva York) y una clonación en EYFP-N1 (*SacI* / *ApaI*). La EYFP-Topo-II α se elaboró cambiando la etiqueta de la EGFP (*EcoRI* / *NheI*) por la etiqueta de la EYFP (*XhoI* / *NheI*) de la EGFP-Topo-II α (pT104-1) (Mo y Beck, 1999) proporcionada generosamente por William T. Beck (Division of Molecular Pharmacology, Department of

Molecular Genetics, University of Illinois, Chicago). Las construcciones hABH2₁₋₇-EYFP que incluían los mutantes F4 se elaboraron mediante la hibridación de oligos con un saliente de XhoI / EcoRI seguida de una clonación en EYFP-N1 mutada en el codón ATG. Todas las mutaciones puntuales se elaboraron mediante una mutagénesis dirigida según el manual de instrucciones del QuickChange® II. Las enzimas de restricción de la fosfatasa alcalina intestinal bovina (CIP) eran de New England Biolabs® Inc. y los oligonucleótidos eran de MedProbe, Eurogentech (Oslo, Noruega). Todas las construcciones fueron verificadas mediante una secuenciación.

Obtención de imágenes confocales y mediciones de la FRET

Se analizaron células HeLa vivas 16-24 horas después de una transfección transitoria (con Eugene 6 (Roche Inc.) según las recomendaciones del fabricante) de las construcciones de fusión ECFP y EYFP. Las imágenes fluorescentes se adquirieron usando un microscopio de barrido láser Zeiss LSM 510 Meta equipado con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromate 63x/1.4. La proteína fluorescente cian mejorada (ECFP) fue excitada a una $\lambda = 458$ nm y detectada a una $\lambda = 470$ -500 nm y la proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP) fue excitada a una $\lambda = 514$ nm y detectada a una $\lambda = 530$ -600 nm, usando barridos consecutivos. El grosor del corte era de 1 μ m.

La transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (FRET) se produce si las etiquetas (EYFP y ECFP) están separadas menos de 100 Å (10 nm). Detectamos la FRET usando el método de emisión sensibilizada, midiendo la emisión del aceptor (EYFP) tras la excitación del donante (ECFP). Tuvimos una FRET cuando la intensidad de la luz emitida desde la EYFP tras la excitación del fluorocromo de la ECFP era más fuerte que la luz emitida por las proteínas etiquetadas solo con la ECFP o con la EYFP, después de la excitación con los láseres de la EYFP y de la ECFP, respectivamente (filtrado), dada por la ecuación: $FRET = I_2 - I_1 (ID_2 / ID_1) - I_3 (IA_2 / IA_3)$ es > 0 . La FRET fue normalizada para los niveles de expresión usando la ecuación: $N_{fret} = FRET / (I_1 \times I_3)^{1/2}$. La N_{fret} se calculó a partir de las intensidades medias (I) en una región de interés (ROI) que contiene más de 25 píxeles en la que todos los píxeles tenían unas intensidades por debajo de 250 y las intensidades medias eran de entre 100 y 200 tanto para la construcción del donante como para la del aceptor. Los canales 1 (ECFP) y 3 (EYFP) se midieron como se ha descrito anteriormente para la obtención de imágenes, y el canal 2 (FRET) se excitó con una $\lambda = 458$ nm y se detectó a una $\lambda = 530$ -600 nm. Se determinaron las ID_1 , D_2 , D_3 y IA_1 , A_2 , A_3 únicamente para las células transfectadas con las construcciones de la ECFP y de la EYFP, con los mismos ajustes y las mismas intensidades de fluorescencia que las células cotransfectadas (I_1 e I_3). La ECFP-PCNA y la EYFP-PCNA se incluyeron como controles positivos, y debido a la dimerización de las etiquetas coexpresadas, las proteínas ECFP y EYFP expresadas a partir de vectores vacíos fueron incluidas como controles negativos en todos los experimentos.

Cultivo de las líneas celulares y preparación de los extractos celulares

Se prepararon células HeLa (de cáncer cervical) y HaCaT (de queratinocito transformado espontáneamente) que expresan de forma estable las construcciones de interés mediante una transfección (con Eugene 6) seguida de una clasificación o una clonación celular mediante dilución, y un cultivo prolongado en medio selectivo (usando gentamicina, G418, 400 μ g/ml, Invitrogen) de Eagle modificado por Dulbecco con un alto contenido en glucosa a 4,5 g/l (DMEM) (BioWaciertotaker®) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FCS), anfotericina B (250 μ g/ml, Sigma-Aldrich), gentamicina (100 μ g/ml, Gibco) y glutamina (1 mM, BioWaciertotaker®). Las células se cultivaron a 37 °C con un 5 % de dióxido de carbono, en una atmósfera humidificada. Los extractos celulares fraccionados de las HeLa se prepararon resuspendiendo los sedimentos celulares en 1x del volumen celular empaquetado (PCV) en tampón I (Tris-HCl 10 mM, a pH 8,0 y KCl 50 mM) y 1x de PCV en tampón II (Tris-HCl 10 mM, KCl 100 mM, 20 % de glicerol, 0,5 % de Nonidet P-40, EGTA 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, 1x de inhibidor completo de la proteasa (Roche), cóctel inhibidor de los fosfatos (PIC I y PIC II, Sigma). Las células se incubaron con agitación constante durante 30 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (fracción soluble). El sedimento (que contiene los núcleos) se resuspendió en 1x PCV de tampón III (Tris-HCl 10 mM, a pH 8,0 y KCl 100 mM) y 1x PCV de tampón II, y se aplicaron ultrasonidos brevemente hasta que todos los núcleos fueron desestabilizados. Se centrifugaron 750 μ g de la fracción que contiene los nucleolos y el sedimento (la fracción unida a la cromatina) se resuspendió en tampón II y III. La fracción unida a la cromatina se incubó con un cóctel de DNase / RNase (2 μ l Omnicleave® Endonuclease (200 U/ μ l, Epicentre® Biotechnologies, WI), 2 μ l de DNase (10 U/ μ l, Roche Inc.), 2 μ l de Bensonase (250 U/ μ l, Novagene, Ge), 2 μ l de nucleasa microcócica (100-300 U/ μ l, Sigma-Aldrich) y 2 μ l de RNase (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) durante 30 min a la temperatura ambiente y 1 h a 37 °C. Se incubaron 750 μ g de la fracción soluble con 2 μ l adicionales de Omnicleave® durante una noche a 4 °C durante la IP.

Co-inmunoprecipitación (co-IP) y análisis mediante inmunotransferencia western (WB).

Se unió covalentemente un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad creado internamente contra la proteína GFP, que también reconoce las proteínas EYFP y ECFP, a microesferas paramagnéticas de proteína-A (Dyna®) según el procedimiento de New England Biolabs® Inc (denominadas a partir de ahora microesferas α -GFP). Cada fracción se incubó con las microesferas α -GFP (10 μ l) durante una rotación constante a 4 °C durante una noche (IP). Después de la IP, las microesferas se lavaron 4 veces con 200 μ l de Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM (a pH 7,5), con 5 min de incubación en hielo entre ellas. Después, las microesferas se resuspendieron en tampón de carga NuPAGE® (Invitrogen) y DTT 1 mM, se calentaron y se separaron con geles al 10 % o al 4-12 % de Bis-Tris-HCl (NuPAGE®) y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon®, Millipore). Las membranas se bloquearon durante 1 h en leche

en polvo baja en grasas al 5 % en PBST (PBS con un 0,1 % de Tween® 20). Los anticuerpos primarios, el α -PCNA (PC10, Santa Cruz biotechnology Inc.) y la α -GFP se diluyeron en un 1 % de leche en polvo en PBST y se incubaron durante 1 h, seguido de 1 h de incubación con los anticuerpos secundarios, IgG anti-ratón policlonal de conejo/HRP e IgG anti-conejo policlonal de cerdo/HRP, respectivamente (DakoCytomation, Dinamarca). Las membranas se trataron con un reactivo quimioluminiscente (SuperSignal® West Femto Maximum, PIERCE), y las proteínas se visualizaron con la Kodak Image Station 2000R.

Análisis de la secuencia

Para un análisis inicial de la secuencia se usaron las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL para hallar las proteínas con unas subsecuencias similares a la región de la secuencia de interés. Las bases de datos fueron consultadas con los motivos en formato PROSITE. Se usó Clustal W para alinear las secuencias de interés. Los motivos conservados recogidos en el archivo complementario 1 fueron identificados mediante la comparación de los genes ortólogos. Los archivos de datos de la versión 5.1 de Inparanoid fueron descargados del servidor web de Inparanoid <<http://inparanoid.sbc.su.se/>> para un subconjunto representativo de organismos. Se usaron las secuencias humanas como referencia, y se buscó en el archivo fasta procesado con Inparanoid una expresión regular para el motivo APIM, usando una herramienta local. Se usó una definición de motivo ligeramente expandida, en la que se permitía una Ala en cualquier posición 3 o 4 del motivo, además de Ile, Val y Leu, pero no en ambas posiciones simultáneamente. De un total de 22218 secuencias de proteínas, había 636 secuencias con al menos un acierto frente al motivo APIM. Estos registros fueron emparejados con respecto a la localización subcelular experimental y predicha en la base de datos eSLDB, descargada del servidor web <<http://gpcr.biocomp.unibo.it/esldb/>>, y se eliminaron 349 registros sin ninguna indicación de un direccionamiento al núcleo. Para los restantes 287 registros se identificaron los correspondientes ortólogos Inparanoid, las secuencias correspondientes se extrajeron a partir de los archivos fasta y las colecciones de secuencias resultantes se alinearon con Clustal W.

Los 24 registros de secuencias sin ortólogos en Inparanoid se eliminaron del análisis. Se usaron dos procedimientos diferentes en paralelo para la identificación de los sitios conservados. En el primer procedimiento (consenso) la secuencia consenso fue estimada a partir de la alineación múltiple de cada posición de acierto en la secuencia humana. Cuando se estima el consenso, los símbolos equivalentes del motivo conservativo APIM (sin Ala) fueron tratados como símbolos equivalentes para la estimación del consenso, de forma que, por ejemplo, Ile, Val y Leu se trataron como un único tipo de residuo. Se ensayó la expresión regular frente al consenso antes de que se aceptara la posición del acierto. En el procedimiento alternativo (individual) se ensayó la expresión regular frente a cada subsecuencia ortóloga correspondiente a una posición de acierto en la secuencia humana, y únicamente se aceptaron las posiciones en las que al menos el 50 % de los ortólogos se emparejaban con la expresión. En esta estimación se excluyeron las subsecuencias que consistían únicamente en huecos, asumiendo que esto podría representar, por ejemplo, variantes de ajuste alternativas. Estos dos procedimientos dieron unos resultados prácticamente idénticos, y el producto combinado se muestra en el archivo complementario 1. En total se eliminaron 37 registros mediante este procedimiento, siendo los 226 registros restantes recogidos y analizados. Las descripciones de proteína usadas en el producto se tomaron a partir del archivo fasta humano no procesado de Inparanoid y Ensembl versión 45. El archivo del producto está en formato html y puede ser abierto por un navegador habitual de páginas web.

Análisis de dot-blot de los péptidos de unión al PCNA predichos

Se preparó una lámina Amino-PEG500-UC540 (endurecida con ácido con una estabilidad mejorada) que contiene puntos de péptido 28 nmol (teñido con Ponceau para visualizar las manchas) en el laboratorio de síntesis de péptidos del The Biotechnology centre de la University of Oslo, Noruega. La membrana se sondeó con 1 μ g/ml de PCNA durante 2 h, seguido de un sondeo con el anticuerpo primario (α -PCNA, PC10) y se desarrolló como se ha descrito anteriormente para la WB.

Ensayo de la supervivencia celular

Se sembraron células HeLa y HaCaT en placas de 96 pocillos (4000 células/pocillo) y se incubaron durante 4 horas. A los pocillos se añadieron varias dosis de MMS (metansulfonato de metilo, Acros), BCNU (1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosurea, Sigma), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, TZM, Sigma) y mitomicina C (carbamato de 6-amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahidro-8-(hidroximetil)-8a-metoxi-5-metilazirino[2',3':3,4]pirrolo[1,2-a]indol-4,7-di-ona, MMC, Sigma). Las células U2OS fueron expuestas únicamente al MMS y la TMZ. Las células fueron expuestas de forma continua hasta que se recogieron. Las células se recogieron cada día durante 4 días usando el ensayo MTT (Mosmann, 1983). La DO se midió a 570 nm, y se usó la media de al menos 6 pocillos para calcular la supervivencia celular. Los datos presentados son el crecimiento de un experimento representativo, y se ha reproducido al menos 2 veces.

Ejemplo 1

Este trabajo descrito en este Ejemplo investiga la localización de la hABH2 en los focos de replicación e identifica la interacción directa entre la hABH2 y el PCNA, y la región de la hABH2 responsable de dicha interacción.

En las células vivas en fase S, el PCNA etiquetado con proteína fluorescente verde (EGFP) forma unos claros focos que representan los sitios de replicación, y por lo tanto puede usarse como un marcador de la fase S.

El PCNA etiquetado con la proteína fluorescente cian (ECFP) era coexpresado con varias construcciones de delección de la hABH2 fusionadas con la proteína fluorescente amarilla (EYFP). Se averiguó que la delección de los 10 aminoácidos N terminales en la hABH2 (hABH2₁₁₋₂₆₁-EYFP) anulaba totalmente la colocalización con el PCNA en los focos de replicación. Notablemente, cuando estos 10 aminoácidos eran fusionados con la EYFP (para dar una construcción denominada hABH2₁₋₁₀-EYFP), eran suficientes para la colocalización con el PCNA. (Figura 1). Notablemente, la coexpresión del ECFP-PCNA aumentaba la localización de la hABH2 completa (hABH2₁₋₂₆₁-EYFP), así como de la hABH2₁₋₁₀-EYFP, en los focos nucleares, en comparación con las células que expresan únicamente las construcciones de la hABH2. Esto sugiere una interacción directa entre el PCNA y la hABH2 mediada por los 10 aminoácidos N terminales de la hABH2.

Para analizar el grado de proximidad de la hABH2 y el PCNA, se midió la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Tanto la hABH2-EYFP como la hABH2₁₋₁₀-EYFP completas generaron una FRET positiva con el ECFP-PCNA, demostrando que la distancia entre las etiquetas fluorescentes es menor de 100 Å. Esto sugiere que las variantes de la hABH2 interactúan directamente con, o están en el mismo complejo que, el ECFP-PCNA (Figura 2).

Para confirmar una interacción directa se llevaron a cabo estudios de coimmunoprecipitación usando extractos proteicos de células que expresan de forma estable la hABH2-EYFP, la hABH2₁₁₋₂₆₁-EYFP, la hABH2₁₋₁₀-EYFP o la EYFP. Se usaron anticuerpos anti-GFP para inmunoprecipitar las respectivas proteínas de fusión. Los posteriores análisis de inmunotransferencia western revelaron que el PCNA endógeno era abatido por la hABH2₁₋₂₁₆-EYFP y la hABH2₁₋₁₀-EYFP, pero no por la hABH2₁₁₋₂₆₁-EYFP o la EYFP. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la hABH2 interactúa directamente con el PCNA, y que la secuencia de unión está contenida en los 10 aminoácidos N terminales de la hABH2s.

Ejemplo 2

Se ensayó la capacidad de la hABH2₁₋₁₀ para inhibir la hABH2.

Se expusieron líneas celulares que expresan la hABH2₁₋₁₀-EYFP o la EYFP sola a los agentes alquilantes MMS (metansulfonato de metilo), BCNU (carmustina), temozolomida (TzM) o mitomicina C (MMC). El MMS es un agente alquilante S_N2 que produce 3-metilcitosina (3meC) y 1-metiladenina (1meA), que son reparadas por la hABH2, mientras que la BCNU es un agente O⁶-cloroetilante que produce principalmente reticulaciones entre las hebras, así como algunos aductos cíclicos monobásicos (1,N(6)etano adenina). Se ha notificado que la TzM es un agente metilante O⁶G, mientras que la MMC provoca enlaces cruzados entre las hebras a través de la N-alquilación de la guanina en las CpG.

La sobreexpresión de la hABH2₁₋₁₀-EYFP o de la EYFP no interfirió con la velocidad de crecimiento de las células sin tratar; sin embargo, se averiguó que la expresión de la hABH2₁₋₁₀-EYFP sensibilizaba a las células HeLa frente al tratamiento con MMS. Sorprendentemente, también se averiguó que la expresión de la hABH2₁₋₁₀-EYFP sensibilizaba a las células HeLa frente a todos los demás agentes citostáticos ensayados (Figura 3). Esto indica que el aumento en la sensibilidad no era causado únicamente por la inhibición de la hABH2, que se cree que fundamentalmente repara la 3meC y la 1meA.

A partir de un estudio previo se sabe que las células de ratón *Abh2*^{-/-}, es decir, las células inactivadas para la ABH2, muestran un aumento en la sensibilidad frente al MMS, pero no frente a la BCNU. Por lo tanto, el aumento en la sensibilidad en las células que expresan la hABH2₁₋₁₀-EYFP frente a agentes citostáticos tales como la BCNU no podía ser explicada únicamente por la inhibición de la hABH2.

Las células HaCaT (queratinocito transformado espontáneamente) que expresan de forma estable la hABH2₁₋₁₀-EYFP también eran hipersensibles frente al MMS y a la TMZ.

El análisis del ensayo de flujo y del cometa de las células después del tratamiento con los diferentes agentes alquilantes demostró que los fármacos afectaban de forma diferente al ciclo celular, y que inducían diferentes niveles y patrones de intermedios de reparación del ADN (sitios abásicos, SSB, DSB), según se detectó mediante el ensayo del cometa. El MMS produjo una detención en la fase S (día 1) y dio unos niveles mayores de intermedios de reparación del ADN después de 4 horas. Sin embargo, las células tratadas con el MMS mostraron una distribución normal del ciclo celular y ningún aumento en el nivel de los intermedios de reparación del ADN el día 2. De forma similar al MMS, la TMZ también produjo unos mayores niveles de intermedios de reparación después de 4 horas, sin embargo, las células se detuvieron en G2/M hasta el día 3, lo que indica un daño y un patrón de reparación diferentes. La TMZ también indujo más rupturas en las hebras que los otros tres agentes ensayados. Esto es sorprendente, dado que se cree que la TMZ induce principalmente una O⁶metil-G, que es reparada por un mecanismo de reparación directo por la MGMT, que no implica la eliminación de ninguna base ni la ruptura de hebras. El tratamiento con BCNU produjo una detención temporal en G2/M el día 1 y unos niveles muy bajos de intermedios de reparación, lo que indica que la

mayoría de las células que contienen las reticulaciones murió. El tratamiento con MMC, por otro lado, produjo una detención en la fase S los días 1 y 2, y ésta era más pronunciada para las células que expresan la hABH2₁₋₁₀-EYFP que para las células de control. Las células todavía estaban detenidas en G2/M el día 3. No pudieron observarse diferencias significativas entre las líneas celulares en el ensayo del cometa después del tratamiento con MMC, pero el número de intermedios de reparación tuvo un máximo el día 2.

Generalmente, no era posible detectar ninguna diferencia significativa en la cantidad de intermedios de reparación entre las células que expresan la EYFP y la hABH2₁₋₁₀-EYFP mediante el ensayo del cometa. Los análisis del cometa y de flujo demostraron que los diferentes agentes usados inducen tanto diferentes respuestas el ciclo celular como diferentes patrones de reparación. Aun así, todos los agentes habían aumentado la citotoxicidad en las células que expresan el APIM en comparación con las células que expresan la EYFP, apoyando por tanto un papel para diversas proteínas que contienen un APIM en la regulación entre la reparación o la muerte celular.

Ejemplo 3

Una alineación de las secuencias de la ABH2s de las bases de datos de varias especies diferentes reveló que los 7 aminoácidos N terminales están muy conservados (Figura 4). Para identificar una secuencia de unión, se analizó la importancia de estos aminoácidos para la interacción péptido-PCNA usando un ensayo de dot blot. Entre otros, se encontró que la Arg3 y la Lys7 podrían sustituirse entre sí, y que la Leu5 y la Val6 podrían sustituirse entre sí o por otros aminoácidos alifáticos tales como Ile y Ala sin afectar a la afinidad aparente frente al PCNA. Adicionalmente, el aminoácido aromático completamente conservado Phe4 podría ser sustituido por Tyr, mientras que una Ala en esta posición redujo significativamente la unión al PCNA.

Las sustituciones de los aminoácidos 1-2 y 8-10 por Ala no afectaron a la unión al PCNA, lo que sugiere el pentapéptido RFLVK (SEQ ID NO. 2) como la secuencia de interacción central.

Algunos ensayos adicionales revelaron que este pentapéptido era por sí mismo suficiente para la unión al PCNA, pero que los aminoácidos flanqueantes adicionales aumentaban la interacción.

Después, los aminoácidos 1-7 de la hABH2, y las variantes de esta secuencia en las que la Phe4 era sustituida por Tyr, Trp o Ala, fueron expresados en una fusión con la EYFP y ensayados para evaluar la colocalización con el PCNA *in vivo*. De forma similar a lo que se averiguó con el ensayo de dot blot, las proteínas de fusión que contienen un aminoácido aromático en la posición 4 se colocalizaban con el ECFP-PCNA, mientras que las proteínas con Ala en esta posición no lo hacían.

Ejemplo 4

Se usaron las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL para encontrar proteínas con unas subsecuencias similares a la secuencia que había sido identificada como responsable de la unión de la hABH2 al PCNA. Usando el consenso [KR]-[FYW]-[LIVA]-[LIVA]-[KR] (SEQ ID NO. 30) como la consulta, se obtuvieron 226 aciertos (véase la Tabla 1 para un resumen), de los que se eligieron varias proteínas humanas para un análisis adicional.

Una era una proteína que, al igual que la hABH2, contiene la anterior secuencia consenso en sus 7 aminoácidos N terminales. Esta proteína también contiene el dominio I conservado N terminal que se encuentra en el factor de elongación TFIIS, una proteína importante para la progresión de la transcripción detenida. Los inventores denominaron a esta proteína como proteína similar al TFIIS (TFIIS-L). La función de esta proteína es desconocida.

La segunda proteína es el factor de transcripción multifuncional TFII-I, que contiene las secuencias consenso 4. El TFII-I es crítico para el control del ciclo celular y la proliferación, y las células que sobreexpresan el TFII-I tienen un aumento en la persistencia de los focos γ -H2AX (un marcador de la ruptura de la doble hélice del ADN), lo que sugiere un papel del TFII-I en la reparación del ADN.

También se analizó la topoisomerasa de ADN II alfa (Topo II α) que contiene una secuencia consenso. La Topo II α funciona en la descatenación post-replicativa del ADN y en la segregación del ADN.

También se encontró internamente una secuencia consenso en la proteína de reparación de la escisión de nucleótidos clave (NER) XPA que reconoce giros de hélice.

Se encontró una secuencia consenso en la RAD51B, una proteína de recombinación homóloga que se ha demostrado que es importante para la apropiada función del centrosoma y la segregación del cromosoma.

Otra proteína era la proteína del complejo nuclear de la anemia de Fanconi, FANCC, que se averiguó que contiene una secuencia consenso. La anemia de Fanconi (FA) es un raro trastorno genético caracterizado por una anemia aplásica, un aumento en la susceptibilidad a la leucemia y una hipersensibilidad frente a los agentes de reticulación. Se ha demostrado que el complejo del núcleo de la FA está implicado en la ruta de señalización activada por los daños en el ADN que regula la reparación del ADN de los agentes de reticulación.

En todas estas proteínas se encontró que el probable motivo de unión al PCNA está conservado a través de las diferentes especies (Figura 5). De entre estas cinco proteínas, se ha notificado que únicamente la Topo II α y la FANCC (después del daño) se colocan con el BRCA1 en los focos nucleares en la fase S, y la Topo II α es la única proteína que contiene una potencial caja PIP (QttLaFkp, aa 1277-84). Los inventores han demostrado ahora que las proteínas de fusión EYFP de todas y cada una de estas proteínas se colocan con el ECFP-PCNA en los focos de la fase S.

Otras interesantes proteínas que contienen un APIM encontradas son los miembros de la familia Poli(ADP-ribosa) (PARP-1, 2 y 4) implicados en diversos procesos de mantenimiento del ADN, que incluyen la reparación del ADN, el compañero PARP-1 y la isoforma de la Topo II α topoisomerasa de ADN II beta, implicados en la resolución de los problemas topológicos causados por las horquillas de replicación. Adicionalmente, el APIM se encuentra en la subunidad REV3L de la polimerasa de translesión ζ , implicada tanto en las mutagénesis puntuales como en la estabilidad del genoma a una escala mayor, las ligasas de ADN I y IV, implicadas tanto en la replicación como en la reparación del ADN, las cuatro ligasas de ubiquitina-proteína E3 (UHRF1 y UHRF2/NIRF, UBR1 y 2), todas implicadas en la regulación del ciclo celular, el mantenimiento y la integridad del genoma, así como otras diversas ligasas de la ubiquitina E3 (Tabla 1). De forma interesante, se ha demostrado que las ligasas de la ubiquitina E3 están frecuentemente alteradas genética y expresionalmente en la tumorigénesis de mama. También contiene el APIM la N-acetiltransferasa de ESCO1/EFO1, una proteína cuyo ortólogo de levadura se une al PCNA a través de su caja PIP trunca, y que está implicada en la apropiada cohesión de las cromátidas hermanas, y en la proteína humana de mantenimiento estructural del cromosoma 5, la hSMC5, que se ha demostrado que está implicada en la reparación del ADN por rupturas en la doble hebra a través de una HR y en el mantenimiento de los telómeros en células ALT. Finalmente, se ha averiguado que varias subunidades de los factores de transcripción general II y III, subunidades de la ARN polimerasa II y las cinasas de proteína de serina/treonina, contienen el motivo APIM (Tabla 1).

Tabla 1:

Grupo de proteínas de Tipo I	Proteínas que contienen el APIM
Polimerasa de ADN	Subunidad catalítica zeta de la Pol (hREV3L) ¹
Ligasa de ADN	Ligasa de ADN I ¹ , ligasa de ADN IV
Topoisomerasa	Topo II alfa ⁷ Topo II beta ²
Proteína de reparación del ADN	hABH2 *, XPA *, PARP-1 ³ , 2 y 4, RAD51B *, FANCC * ⁴
Proteínas de reparación asociadas/que interactúan con el ADN	Proteína de unión a la XPA 2, subunidad del complejo que contiene BRCA1/BRCA2 45 (prot-BRE), proteína asociada a la resistencia a la radiación de rayos X 1
Cohesión de las cromátidas hermanas	N-acetiltransferasa de ESCO1/EFO1 ¹ , hSMC5 ⁵
Proteínas de remodelado de la cromatina y de unión al ADN	Proteína de unión al ADN de la helicasa del cromodominio 3, 4 y 5, subunidad p325 del complejo de remodelado de la cromatina RSF, proteína de unión a la repetición telomérica 2 (TRF2) ⁶
Ligasas de la ubiquitina E3	UHRF1, UHRF2, UBR1, UBR2, proteínas con un dedo Ring 3, 17 y 151, probable ligasa de E3 ubiquitina-proteína MYCBP2
Procesado de la ubiquitina	Proteasa de procesamiento específico de la ubiquitina (FAF-X)
Procesado de la SUMO	Proteasa específica de sentrina/SUMO-SEN2
Factores de transcripción	TFIIS-L *, TFII-I *, TFII-E-alfa, factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides 2 (SREBF2), subunidad alfa del TFIIC, subunidad de 100 kDa del TFIID (TAF5), subunidad de 102 kDa del TFIIC (TF3C gamma), proteína similar al factor de transcripción MRG15 y X (proteína similar al factor de mortalidad 4 1 y 2), factor de transcripción E2F ⁷
Reguladores del ciclo celular	Asociado al ciclo de división celular 2, mediador de la muerte celular de interacción con la Bcl2, proteína del gen 2 relacionado con la apoptosis de los espermatocitos testiculares
Cinasas de proteínas	Cinasas de proteína de serina/treonina (S/T) SRPK1 y 2, 33 y MST4, cinasa de proteína S/T 1 de la repetición rica en leucina, STK23 (cinasa de proteína de S/T 23), cinasa de proteína de S/T PLK3, cinasa de proteína de S/T asociada a los microtúbulos, cinasa de proteína de S/T asociada a los microtúbulos 1, subunidad gamma de la P13-cinasa p110, activador de la cinasa de proteína A dependiente de ARN bicatenario inducible por interferón, cinas de fosoinositido que contiene un dedo FYVE, cinasa C2-beta del fosoinositido 3, cinasa 5 de tipo II alfa y beta del fosfatidilinositol-4-fosfato, isoforma alfa de la subunidad catalítica de la 3-cinasa del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, cinasa MAPKAP 2 y 5, cinasa de proteína activada por mitógeno 15 (MAP 15)

(continuación)

Grupo de proteínas de Tipo I	Proteínas que contienen el APIM
Metiltransferasa	MLL3H3 específica de la lisina-4, metiltransferasa H3-K9 5, probable metiltransferasa de ARNr 3
Acetiltransferasa	Transferasa de diacetilglicerol O-acetilo (DGAT1)
Antígenos asociados al cáncer	Antígeno asociado al melanoma E1, MAGE E1, MAGE B18, MAGE-G1, proteína de reconocimiento tumoral NK (NK-TR), proteína asociada a la proteína de unión al Myc, proteína de unión al Myb 1A, isoforma 1 de la proteína relacionada con el factor de crecimiento derivado de hepatoma 2, antígeno de cáncer de colon definido serológicamente 1
Proteínas estructurales	Lamina-B1 y B2, proteínas similares a la actina 2
Centrosoma, cinesinas,	Proteína del centrosoma 1 de 10 kDa (Cep 110), proteína del centrosoma de 192 kDa, motor de cinesina dirigido al microtúbulo más el extremo 3 (KIF3A), cadena pesada de la cinesina (UKHC), proteína asociada al kinetochore 1

En negrita: proteínas localizadas en los focos de replicación en afecciones normales o después de daños en el ADN. Este estudio * o en otra parte:

¹ G. L. Moldovan, B. Pfander y S. Jentsch, Cell 129 (4), 665 (2007).

² Z. Lou, K. Minter-Dykhouse y J. Chen, Nat Struct Mol Biol 12 (7), 589 (2005); A. Niimi, N. Suka, M. Harata et al., Chromosoma 110 (2), 102 (2001).

³ C. M. Simbulan-Rosenthal, D. S. Rosenthal, S. Iyer et al., Molecular and cellular biochemistry 193 (1-2), 137 (1999).

⁴ C. Jacquemont y T. Taniguchi, BMC biochemistry 8 Supl. 1, S10 (2007).

⁵ P. R. Potts, M. H. Porteus y H. Yu, Embo J 25 (14), 3377 (2006).

⁶ P. L. Opresko, M. Otterlei, J. Graakjaer et al., Mol Cell 14 (6), 763 (2004).

Ejemplo 5

- 5 Se analizó experimentalmente la función de la secuencia consenso en las proteínas estudiadas en el Ejemplo 4. Debido a que la sustitución en la secuencia consenso del aminoácido aromático Phe por Ala abolió la interacción con el PCNA *in vitro* y la colocalización con el PCNA *in vivo*, se analizó si la correspondiente mutación tenía un efecto similar en las proteínas completas. La mutación de la Phe4 por Ala en la hABH2 completa abolió la colocalización con el PCNA. En el TFII-I, que contiene 4 de los motivos, los residuos de Phe (F431A, F536A, F641A y F803A) fueron
- 10 sustituidos individualmente y en conjunto por Ala. Ninguna mutación individual redujo la colocalización con el PCNA, pero las mutaciones en la totalidad de las secuencias consenso del TFII-I redujeron de forma importante la colocalización con el PCNA en los focos de replicación, demostrando que los diversos motivos de la secuencia consenso presentes en la misma proteína pueden contribuir a una interacción óptima con el PCNA.

Referencias

Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P. O., Vagbo, C. B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E. y Krokan, H.E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. Nature 421, 859-863.

20 Mo, Y. Y. y Beck, W. T. (1999). Association of human DNA topoisomerase II alpha with mitotic chromosomes in mammalian cells is independent of its catalytic activity. Experimental cell research 252, 50-62.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65, 55-63.

Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Mone, M. J., Van Zeeland, A. A., Hoeijmakers, J. H., Houtsmuller, A. B. y Vermeulen, W. (2003). Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. Mol Cell Biol 23, 5755-5767.

30 Roy, A. L., Malik, S., Meisterernst, M. y Roeder, R. G. (1993). An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. Nature 365, 355-359.

Ejemplo 6

35 Preparación y ensayo de las construcciones que contienen un péptido que contiene un motivo ("APIM") con secuencias de señalización

40 Se sintetizaron los péptidos de las SEQ ID NOS. 98 hasta 117 usando las técnicas convencionales, y se incorporaron etiquetas fluorescentes, cuando se indica, de nuevo usando técnicas convencionales. Los péptidos se muestran en la Tabla 3, que muestra la secuencia de aminoácidos de cada péptido, y también recoge por separado los componentes individuales que forman cada péptido (motivo (péptido que contiene el motivo ("APIM"), la NLS, el CPP y los

conectores, según sea apropiado y la etiqueta usada, cuando están contenidos) Los péptidos de las SEQ ID NOS. 98 hasta 116 están formados por aminoácidos L. El péptido RI-MDR26-3 de la SEQ ID NO. 117 es un péptido retro-inverso formado por aminoácidos D. Todos los péptidos mostrados en la Tabla 3 tienen al menos un péptido APIM, una NLS y un CPP.

Se llevaron a cabo varios estudios para mostrar el efecto de los péptidos sobre las células. Por lo tanto, las células se incubaron con los péptidos para determinar la localización de los péptidos en las células, usando unas técnicas basadas en las descritas en los anteriores Ejemplos. En resumen, los péptidos indicados para ser marcados con las etiquetas fluorescentes se incubaron con células (células HeLa) y la importación celular se analizó usando microscopía confocal.

Los efectos de los péptidos para sensibilizar las células frente a los efectos de los fármacos citostáticos se investigaron usando un ensayo de MTT y un ensayo clonogénico (ensayo CFU) como se describe a continuación.

Se investigó la citotoxicidad de los péptidos mediante un ensayo MTT como se describe a continuación, usando los péptidos solos, en ausencia de fármacos citostáticos. Los datos de la citotoxicidad también se obtuvieron a partir de los controles usados en los ensayos con el fármaco citostático MTT (controles con péptido pero sin fármaco citostático), en los que los péptidos de control fueron controlados durante más tiempo (4 días).

Se investigó la toxicidad de la membrana, de nuevo como se describe a continuación.

Se investigó la estabilidad de los péptidos mediante un análisis de EM de los péptidos después de la incubación de los péptidos en medio que contiene suero.

Ensayo de MTT

Se sembraron células HeLa en placas de 96 pocillos (6000 células/pocillo) y se incubaron durante 3 horas. Se añadieron varias dosis de MMS y de cisplatino a los pocillos. Después de 24 horas se añadieron los péptidos a las células en medio exento de suero, y se incubaron durante 1 h. Se añadió un medio reciente con los fármacos citostáticos y las células se recogieron después de 24, 48 y 72 horas adicionales. Se añadió el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a las células y se midió la DO a 570 nm [52] y se usó la media de al menos 6 pocillos para calcular la supervivencia celular. Los datos se presentan como el crecimiento a partir de un experimento representativo y ha sido reproducido al menos 2 veces.

Ensayo clonogénico (CFU)

Se sembraron 750 células HeLa en placas de cultivo celular de 10 cm en 11 ml de medio de crecimiento que contiene fármacos citostáticos (MMS). El segundo día, las células se trataron con los péptidos durante una hora en unas condiciones exentas de suero. Se añadió medio reciente que contiene los fármacos citostáticos recientes a las células para una incubación adicional durante 10 días. Después, las células se fijaron con glutaraldehído al 6 % en PBS durante 15 min a la temperatura ambiente, se lavaron una vez con PBS y se tiñeron con violeta de cristal y se contaron las unidades formadoras de colonias. Únicamente se incluyeron las colonias que consisten en al menos 50 células.

Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los péptidos después de 48 horas se midió usando el ensayo MTT. Se sembraron células HeLa en placas de 96 pocillos (6000 células/pocillo) y se incubaron durante 3 horas. Se añadieron varias dosis de los péptidos a los pocillos en presencia o en ausencia de suero en el medio. Después de 1 h se añadió un volumen de medio igual con 1X o 2X (al medio exento de suero) y las células se incubaron durante 48 horas antes de la adición del MTT (véase más arriba)

Toxicidad de la membrana mediante una citometría de flujo

Las células se trataron con diferentes concentraciones (2, 4 y 8 μ M) de péptido durante 1 hora. Después se añadió yoduro de propidio (PI) (50 μ g/ml en PBS), éste teñirá el ADN si las membranas celulares son permeables. Los análisis se llevaron a cabo en los siguientes 10 minutos con un citómetro de flujo FACS Canto (BD-Life Science).

Los resultados se muestran en la Tabla 4. A partir de esto puede apreciarse que todos los péptidos ensayados marcados con etiqueta, que son esencialmente construcciones de un péptido que contiene un APIM con un CPP y una NLS, se localizan en el núcleo. Este efecto se observó para los péptidos con diferentes secuencias conectoras conectando los componentes individuales de la construcción, con conectores de longitud variable y con péptidos sin secuencias conectoras. Esto demuestra que la presencia de las secuencias conectoras no es esencial, y que la secuencia conectora puede ser diversa.

Los resultados de los experimentos de MTT y de CFU con agentes citostáticos muestran el efecto de los péptidos en el aumento de los efectos inhibidores del crecimiento de los agentes citostáticos. Por lo tanto, los péptidos son capaces

de sensibilizar a las células frente a los efectos de los agentes citostáticos. Este efecto es análogo al indicado anteriormente en el Ejemplo 2 para las líneas celulares transfectadas que expresan el péptido que contiene un APIM.

La Tabla 4 también muestra un efecto citotóxico para varios péptidos. Un trabajo experimental adicional (datos no mostrados) ha indicado que se observa un mayor efecto citotóxico con los péptidos que se localizan en el núcleo, en comparación con los que no. Un experimento de toxicidad de la membrana llevado a cabo con un péptido (MDR2; SEQ ID NO. 98) parece indicar que la toxicidad de la membrana es baja, lo que puede sugerir que el efecto citotóxico observado para los péptidos no es debido a un efecto sobre la membrana. Se ha observado que en algunos casos, el efecto citotóxico puede observarse únicamente con unas concentraciones crecientes de péptido (por ejemplo, a 1 μ M puede no observarse la citotoxicidad del péptido (aunque se observa un efecto en la sensibilización de las células frente a un agente citostático), mientras que a 2 μ M de péptido se observa un efecto citotóxico del propio péptido, así como el efecto sensibilizante).

Los resultados de la Tabla 4 también muestran que los efectos de los péptidos para entrar en la célula y localizarse en el núcleo, para sensibilizar a las células frente a los agentes citostáticos y de citotoxicidad, pueden obtenerse con diferentes secuencias de NLS y/o de CPP y, aunque la magnitud o el grado del efecto puede variar, los efectos no parecen ser dependientes de las secuencias, en particular de las secuencias de la NLS y/o del CPP.

Algunos péptidos, como se muestra en las Tablas 3 y 4, incorporaban un grupo Ac en el N terminal. Este fue incluido con la aspiración de estabilizar los péptidos, tanto en suero como en citosol. El péptido MDR26-72-0 (SEQ ID NO. 112) mostró una buena estabilidad y una buena actividad en los ensayos de CFU y de MTT y en las pruebas de citotoxicidad. El MDR26-72-0 contiene una secuencia rica en R como el CPP. Se cree que igualmente podrían obtenerse buenos resultados con péptidos equivalentes en los que el CPP esté sustituido por un derivado del CPP o basado en el Penetratin o en el TAT del VIH, en los que la NLS puede ser derivada del SV40 o de la UNG2).

TABLA 3

SEQ ID NO:	Péptido	Secuencia peptídica total	Secuencia del APIM	Conector 1	NLS	Conector 2
98	MDR2	MDRWLVKGAKPKKKRVLRLQIKWIFQN RRMKWKK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	GAQ	PKKKRKVL (SEQ ID NO: 123)	
99	MDR27	MDRWLVKGAWKKKKRVLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	GAW	KKKRVK (SEQ ID NO: 124)	II
100	MDR26-0	MDRWLVKGAWKKKKRVLIRKKRRRRK	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	GAW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
101	MDR26-1	MDRWLVKGAWKKKKRVLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	GAW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
102	MDR26-2	MDRWLVKRIWKKKKRVLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	RIW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
103	MDR26-3	MDRWLVKWWKKKKRVLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	WWW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
104	MDR26-4	MDRWLVKWRKRFLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	WW	RKRHIKK(SEQ ID NO: 126)	
105	MDR26-7	MDRWLVKRIWKKKKRVLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	RIW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
106	MDR26-8	MDRWLVKRIWKKKKRVLIRQIKWIFQNRRMKWKK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	RIW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
107	MDR26-10	MDRWLVKGAWKKKKRVLIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 119)	GAW	RKRHIKK(SEQ ID NO: 126)	
108	MDR26-72	MDRWLVKWKKKKKRVLIRKKRRRRK-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	W	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	I
109	MDR26-32	MDRWLVKWKKKKKRVLIRKKRRRRK-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	W	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	I
110	MDR26-42	MDRWLVKWRKRHIKKRRRRK-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	W	RKRH (SEQ ID NO: 127)	I
111	MDR24-43	MDRWLVKGAWKKKKRVLIRKKRRRRK-FITC	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	GAW	RKRH (SEQ ID NO: 127)	I
112	MDR26-72-0	Ac-MDRWLVKWKKKKKRVLIRKKRRRRR	Ac-MDRWLVK (SEQ ID NO: 120)	W	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	I
113	MDR26-72-A	Ac-MDRALVKWKKKKKRVLIRKKRRRRR	Ac-MDRALVK (SEQ ID NO: 121)	W	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	I
114	MDR26-72-011	Ac-MDRWLVKWKKKKKRVLIRKKRRRRR-Ahx5-FAM)G	Ac-MDRWLVK (SEQ ID NO: 120)		KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	
115	MDR26-72-01	Ac-MDRWLVKWKKKKKRVLIRKKRRRRR	Ac-MDRWLVK (SEQ ID NO: 120)		KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	
116	MDR34	MDRWLVKRIWKKKKRVLIRWLVKWWRRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	MDRWLVK (SEQ ID NO: 118)	RIW	KKKRVK (SEQ ID NO: 125)	II
117	RI-MDR26-3	FITC-KRRRQRRKKRVLIRKKKKWWW KVLWRDM	KVLWRDM (SEQ ID NO: 122)	WWW	KRKKK (SEQ ID NO: 128)	II
SEQ ID NO:	Péptido	Secuencia peptídica total	2° APIM	Conector 3	CPP	Etiqueta
98	MDR2	MDRWLVKGAKPKKKRVLRLQIKWIFQN RRMKWKK- Ahx5-FAM)G			RQIKWIFQNRMRMKWK (SEQ ID NO: 129)	K-Ahx-5-FAM)G

(continuación)

SEQ ID NO:	Péptido	Secuencia peptídica total	Secuencia del APIM	Conector 1	NLS	Conector 2
99	MDR27	MDRWLVKGAWKKKRVKIIIRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
100	MDR26-0	MDRWLVKGAWKKKRIIRKKRRQRRRG			RKKRRQRRRG (SEQ ID NO: 131)	Sin etiqueta
101	MDR26-1	MDRWLVKGAWKKKRIIRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
102	MDR26-2	MDRWLVKRIWKKKRIIRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
103	MDR26-3	MDRWLVKWWKKKRIIRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
104	MDR26-4	MDRWLVKWWWRKRHIIRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
105	MDR26-7	MDRWLVKRIWKKKRIIRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 132)	K-Ahx-5-FAM)G
106	MDR26-8	MDRWLVKRIWKKKRIIRKIQIWFQNRMMKWK-Ahx5-FAM)G			RQIKIWFQNRMMKWK (SEQ ID NO: 129)	K-Ahx-5-FAM)G
107	MDR26-10	MDRFLVKGAWKRHRHKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
108	MDR26-72	MDRWLVKWKKKRIIRKKRRQRRRK-FAM)G			RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 132)	K-FAMG
109	MDR26-32	MDRWLVKWKKKRIIRKKRRQRRRK-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-FAMG
110	MDR26-42	MDRWLVKWRKRRIIRKKRRQRRRK-FAM)G			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-FAMG
111	MDR24-43	MDRWLVKGAWKRRIIRKKRRQRRRK-FITC			RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-FITC
112	MDR26-72-0	Ac-MDRWLVKWKKKRIIRKKRRQRRRRR			RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 132)	Sin etiqueta
113	MDR26-72-A	Ac-MDRALVKWKKKRIIRKKRRQRRRRR			RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 132)	Sin etiqueta
114	MDR26-72-011	Ac-MDRWLVKWKKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G			RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 132)	K-Ahx-5-FAM)G
115	MDR26-72-01	Ac-MDRWLVKWKKKRRQRRRRRRR			RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 132)	Sin etiqueta

(continuación)

SEQ ID NO:	Péptido	Secuencia peptídica total	Secuencia del APIM	Conector 1	NLS	Conector 2
116	MDR34	MDRWLVKRIWKKKKRIIRWLVKWWWRKKRRQRRRK-Ahx5-FAM)G	RWLVK (SEQ ID NO: 134)	WWW	RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 130)	K-Ahx-5-FAM)G
117	RI-MDR26-3	FITC-KRRRQRRKKRIKRKKKWWW KVLWRDM			RRRQRRKKR (SEQ ID NO: 133)	K-FITC

TABLA 4

SEQ ID NO:	Péptido	Secuencia peptídica total	Localización	CFU	MTT	Estabilidad	Citotoxicidad	Toxicidad de la membrana
98	MDR2	MDRWLVKGAPKKKKRVLQIKIWFQNRMMKKK-Ahx5-FAM)G	núcleo		+	+		Baja
99	MDR27	MDRWLVKGAWKKKRVKIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo		+	+		
100	MDR26-0	MDRWLVKGAWKKKKIRKKRRRRG	desconocida	+			+	
101	MDR26-1	MDRWLVKGAWKKKKIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	+		+		
102	MDR26-2	MDRWLVKRIWKKKKIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	+		+		
103	MDR26-3	MDRWLVKWWWWKKKKIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	++	++	+	+	
104	MDR26-4	MDRWLVKWWRRKKKKIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	++	++	+	+	
105	MDR26-7	MDRWLVKRIWKKKKIRKKRRRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	++	++	+	+	
106	MDR26-8	MDRWLVKRIWKKKKIRKKRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	++	++	++	+	
107	MDR26-10	MDRFLVKGAWKKRHI IKKKRRRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	+				
108	MDR26-72	MDRWLVKWKKKKKIRKKRRRRRRK-FAM)G	núcleo	++	++	+		
109	MDR26-32	MDRWLVKWKKKKKIRKKRRRRRRK-FAM)G	núcleo	++	++	+		
110	MDR26-42	MDRWLVKWRKRHIKKRRRRRRK-FAM)G	núcleo	++	++	+		
111	MDR24-43	MDRWLVKGAWKKRHIKKRRRRRRK-FITC	núcleo	++		+		
112	MDR26-72-0	Ac-MDRWLVKWKKKKKIRKKRRRRRRRR	desconocida	++	++	++	++	
113	MDR26-72-A	Ac-MDRALVKWKKKKKIRKKRRRRRRRRRR	desconocida	-	(+)	++	(+)	
114	MDR26-72-011	Ac-MDRWLVKWKKKKKIRKKRRRRRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	-	+	++	(+)	
115	MDR26-72-01	Ac-MDRWLVKWKKKKKIRKKRRRRRRRR	desconocida	-	(+)	++	(+)	
116	MDR34	MDRWLVKRIWKKKKIRWLVKWWWWKKRRRRRRK-Ahx5-FAM)G	núcleo	-	-	++	++	

Ejemplo 7Datos adicionales de citotoxicidad

En este Ejemplo se presentan datos más detallados de las pruebas de citotoxicidad. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo según se describe en el Ejemplo 6 anterior. Los resultados se presentan en la Figura 6, que muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad de MTT para los péptidos MDR26-0 (SEQ ID NO. 100), MDR26-3 (SEQ ID NO. 103), MDR26-4 (SEQ ID NO. 104), MDR26-8 (SEQ ID NO. 106), MDR26-7 (SEQ ID NO. 105), MDR26-72-0 (SEQ ID NO. 112), MDR26-72-01 (SEQ ID NO. 115) y MDR34 (SEQ ID NO. 116).

Se apreciará que puede observarse la citotoxicidad de los péptidos, observándose un mayor efecto en ausencia de suero. La citotoxicidad es observada con todos los péptidos de la variante MDR26, que tienen un motivo APIM. El aumento en la citotoxicidad se observa con las variantes MDR34 que tienen dos motivos APIM. Unos resultados similares muestran que la citotoxicidad se obtiene con los péptidos que se corresponden con MDR34 (SEQ ID NO. 116) que no tienen etiqueta (MDR34-0) o que son los equivalentes inverso (I-MDR-34) o retroinverso (RI-MDR-34) del MDR34. El MDR34-2 que no tiene una secuencia NLS, y que en su lugar tiene una secuencia conectora extendida IILVIII (SEQ ID NO. 95) como conector 2, muestra una citotoxicidad reducida.

Ejemplo 8

Se han llevado a cabo experimentos adicionales que apoyan la interacción entre el PCNA y los péptidos que contienen un APIM. Los experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) han demostrado que tanto el PCNA endógeno como el EYFP-PCNA de las células que expresan de forma estable el EYFP-PCNA eran capaces de abatir la hABH2. Más interacción observada entre la hABH2 y el PCNA en fracciones enriquecidas en cromatina indica modificaciones post-traduccionales en el PCNA o la hABH2. En estos experimentos se demostró la co-IP de la hABH2 de las células que expresan de forma estable el EYFP-PCNA, usando microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos contra la α -EYFP. La membrana se sondeó con α -hABH2 y se re-sondeó con anticuerpo α -PCNA. También se demostró la co-IP de la hABH2 en células que sobreexpresan las proteínas endógenas usando microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos contra el α -PCNA. La membrana se sondeó con α -hABH2 y se re-sondeó con anticuerpo α -PCNA.

Algunos experimentos adicionales que muestran la reticulación *in vivo* apoyan la unión directa entre el APIM y el PCNA. Las proteínas de fusión FLAG reticuladas y reticuladas revertidas de las células que expresan de forma estable la hABH21-7-EYFP 3xFLAG y la hABH21-7-F4A-EYFP 3xFLAG se inmunoprecipitaron usando un gel de afinidad α -FLAG. Las fracciones de elución de la IP se analizaron mediante inmunotransferencias Western usando anticuerpos α -PCNA o α -FLAG.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> APIM Therapeutics AS

<120> Compuestos oligopeptídicos y usos de los mismos

<130> 20.95626/23

<150> GB0803352.4

<151> 22-02-2008

<160> 134

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> APIM consenso

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> X puede ser cualquier aminoácido básico genético o no genético y puede estar modificado

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido lipófilo genético o no genético y puede estar modificado

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(4)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido sin carga genético o no genético y puede estar modificado

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido básico genético o no genético y puede estar modificado

15 <400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

20 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> motivo de unión a PCNA (APIM)

<400> 2

Arg Phe Leu Val Lys
1 5

30 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Variante de APIM

<400> 3

Lys Phe Leu Leu Arg
1 5

40 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Variante de APIM

50 <400> 4

Lys Tyr Leu Leu Arg
1 5

55 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Variante de APIM	
5	<400> 5	
	Lys Trp Leu Leu Arg	
	1 5	
10	<210> 6	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 6	
	Lys Tyr Ile Leu Arg	
	1 5	
20	<210> 7	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 7	
30	Lys Tyr Val Leu Arg	
	1 5	
35	<210> 8	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 8	
	Arg Phe Leu Leu Arg	
	1 5	
45	<210> 9	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 9	
55	Arg Tyr Leu Leu Arg	
	1 5	
	<210> 10	
	<211> 5	

	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 10	
	Arg Trp Leu Leu Arg	
10	1	5
	<210> 11	
	<211> 5	
	<212> PRT	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 11	
20	Arg Tyr Ile Leu Arg	
	1	5
	<210> 12	
	<211> 5	
25	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Variante de APIM	
30	<400> 12	
	Arg Tyr Val Leu Arg	
	1	5
35	<210> 13	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Variante de APIM	
	<400> 13	
	Arg Phe Leu Ile Arg	
45	1	5
	<210> 14	
	<211> 5	
	<212> PRT	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Variante de APIM	
55	<400> 14	
	Arg Tyr Leu Val Arg	
	1	5

5	<210> 15 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Variante de APIM	
	<400> 15	
		Arg Trp Leu Met Arg 1 5
15	<210> 16 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Variante de APIM	
	<400> 16	
		Arg Tyr Val Leu Arg 1 5
25	<210> 17 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Variante de APIM	
	<400> 17	
35		Arg Tyr Val Ile Arg 1 5
40	<210> 18 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Variante de APIM	
	<400> 18	
		Arg Trp Leu Val Lys 1 5
50	<210> 19 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Variante de APIM	
	<400> 19	

ES 2 912 122 T3

Arg Tyr Leu Val Lys
1 5

5 <210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Variante de APIM

<400> 20

Arg Trp Leu Ile Lys
1 5

15 <210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Variante de APIM

<400> 21

25 Arg Trp Ile Val Lys
1 5

30 <210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Variante de APIM

<400> 22

Arg Trp Val Val Lys
1 5

40 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Variante de APIM

<400> 23

Arg Trp Ala Val Lys
1 5

50 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de APIM

<400> 24

Arg Tyr Val Val Lys
1 5

5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Variante de APIM

<400> 25

15

Arg Tyr Leu Ile Lys
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Variante de APIM

25

<400> 26

Arg Tyr Leu Met Lys
1 5

30

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Variante de APIM

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /SUSTITUIR="Lys" o "Arg"

40

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(4)
<223> /SUSTITUIR="Leu" o "Ile" o "Val"

45

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /SUSTITUIR="Lys" o "Arg"

50

<400> 27

Xaa Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

55

<210> 28
<211> 5

	<212> PRT				
	<213> Secuencia artificial				
	<220>				
5	<223> Variante de APIM				
	<220>				
	<221> variante				
	<222> (1) .. (1)				
10	<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"				
	<220>				
	<221> variante				
	<222> (2) .. (2)				
15	<223> /SUSTITUIR= "Phe" o "Tyr" o "Trp"				
	<220>				
	<221> variante				
	<222> (3).. (4)				
20	<223> /SUSTITUIR= "Leu" o "lie" o "Val" o "Ala" o "Met"				
	<220>				
	<221> variante				
	<222> (5)..(5)				
25	<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"				
	<400> 28				
		Xaa	Xaa	Xaa	Xaa Xaa
		1			5
30	<210> 29				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia artificial				
35	<220>				
	<223> Variante de APIM				
	<220>				
40	<221> variante				
	<222> (1) .. (1)				
	<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"				
	<220>				
45	<221> variante				
	<222> (2) .. (2)				
	<223> /SUSTITUIR= "Tyr" o "Trp"				
	<220>				
50	<221> variante				
	<222> (3).. (4)				
	<223> /SUSTITUIR= "Leu" o "lie" o "Val" o "Ala" o "Met"				
	<220>				
55	<221> variante				
	<222> (5)..(5)				
	<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"				
	<400> 29				
60		Xaa	Xaa	Xaa	Xaa Xaa
		1			5

5	<210> 30 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Variante de APIM
15	<220> <221> variante <222> (1) .. (1) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
20	<220> <221> variante <222> (2) .. (2) <223> /SUSTITUIR= "Phe" o "Tyr" o "Trp"
25	<220> <221> variante <222> (3).. (4) <223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val" o "Ala"
30	<220> <221> variante <222> (5)..(5) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
	<400> 30
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 1 5
35	<210> 31 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Variante de APIM
45	<220> <221> variante <222> (1) .. (1) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
50	<220> <221> variante <222> (2) .. (2) <223> /SUSTITUIR= "Tyr" o "Trp"
55	<220> <221> variante <222> (3).. (4) <223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val" o "Ala"
60	<220> <221> variante <222> (5)..(5) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
	<400> 31

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

5 <210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Variante de APIM

15 <220>
<221> variante
<222> (1) .. (1)
<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

20 <220>
<221> variante
<222> (2) .. (2)
<223> /SUSTITUIR= "Phe" o "Trp"

25 <220>
<221> variante
<222> (3).. (4)
<223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val" o "Ala" o "Met"

30 <220>
<221> variante
<222> (5)..(5)
<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

<400> 32

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

35 <210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Variante de APIM

45 <220>
<221> variante
<222> (1) .. (1)
<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

50 <220>
<221> variante
<222> (2) .. (2)
<223> /SUSTITUIR= "Phe" o "Trp"

55 <220>
<221> variante
<222> (3)..(4)
<223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val" o "Ala"

60 <220>
<221> variante
<222> (5)..(5)
<223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

<400> 33

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5

5 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Variante de APIM

<220>
 <221> variante
 15 <222> (1) .. (1)
 <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

<220>
 <221> variante
 20 <222> (2) .. (2)
 <223> /SUSTITUIR= "Phe" o "Trp"

<220>
 <221> variante
 25 <222> (3).. (4)
 <223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val"

<220>
 <221> variante
 30 <222> (5)..(5)
 <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

<400> 34

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5

35 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Variante de APIM

45 <220>
 <221> variante
 <222> (1) .. (1)
 <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

50 <220>
 <221> variante
 <222> (2) .. (2)
 <223> /SUSTITUIR= "Phe" o "Tyr" o "Trp"

55 <220>
 <221> variante
 <222> (3).. (4)
 <223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val"

60 <220>
 <221> variante
 <222> (5)..(5)
 <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"

<400> 35	
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
	1 5
5	<210> 36 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Variante de APIM
15	<220> <221> variante <222> (1) .. (1) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
20	<220> <221> variante <222> (2) .. (2) <223> /SUSTITUIR= "Tyr" o "Trp"
25	<220> <221> variante <222> (3).. (4) <223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val"
30	<220> <221> variante <222> (5)..(5) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
35	<400> 36
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
	1 5
40	<210> 37 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Variante de APIM
50	<220> <221> variante <222> (1) .. (1) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
55	<220> <221> variante <222> (3).. (4) <223> /SUSTITUIR= "Leu" o "Ile" o "Val"
60	<220> <221> variante <222> (5)..(5) <223> /SUSTITUIR= "Lys" o "Arg"
<400> 37	

ES 2 912 122 T3

Xaa Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

5 <210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Penetratin
<400> 38

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

15 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> derivado de Penetratin
<400> 39

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5

30

<210>	40
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Secuencia artificial
<220>	
<223>	derivado de Penetratin

```
35      <220>  
      <221> MOD_RES  
      <222> (1)..(1)  
      <223> Nle
```

40 <400> 40

Xaa Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5

45 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> derivado de Penetratin

```

55      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (2)..(2)
      <223> Nle

```

<400> 41

Gln Xaa Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5

5 <210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> derivado de Penetratin

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Nle

15 <400> 42

Phe Gln Xaa Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10

20 <210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> derivado de Penetratin

<400> 43

Arg Arg Glu Lys Trp Lys Lys
1 5

30 <210> 44
<211> 7
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> derivado de Penetratin

40 <400> 44

Arg Arg Gln Lys Trp Lys Lys
1 5

45 <210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> derivado de Penetratin

<400> 45

Lys Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5

5	<210> 46 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> derivado de Penetratin	Arg Lys Met Lys Trp Lys Lys 1 5
10	<400> 46	
15	<210> 47 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> derivado de Penetratin	
20		
25	<220> <221> MOD_RES <222> (3)..(3) <223> Orn <400> 47	
30		Arg Arg Xaa Lys Trp Lys Lys 1 5
35	<210> 48 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> derivado de Penetratin	
40	<400> 48	
45	<210> 49 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> derivado de Penetratin	Arg Arg Met Lys Gln Lys Lys 1 5
50	<400> 49	
55	<210> 50 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	Arg Arg Met Lys Trp Phe Lys 1 5

<220>
<223> derivado de Penetratin

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Orn

10 <400> 50

Arg Xaa Arg Lys Trp Lys Lys
1 5

15 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> derivado de Penetratin

<400> 51

Arg Arg Met Trp Lys Lys Lys
1 5

25 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> derivado de Penetratin

<400> 52

35 <220>
<223> D-penetratin

<400> 53

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

40 <210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> D-penetratin

<400> 53

50 <210> 54
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Pegelina (SynB)

<400> 54

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

5 <210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> HIV-TAT

<400> 55

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

15 <210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Restos 47-57 de TAT de VIH

<400> 56

25 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

30 <210> 57
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> VP22

<400> 57

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Val
20 25 30

Asp

40 <210> 58
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> MAP

ES 2 912 122 T3

<400> 58

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

5

<210> 59

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Transportan

<400> 59

15

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20

25

20

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Transportan-10

<400> 60

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu
20

30

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> KALA

40

<400> 61

ES 2 912 122 T3

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

<210> 62
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pep-1

<400> 62

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 63
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pep-2

<400> 63

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 64
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MPG

<400> 64

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 65
<211> 19
<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido Vectocell
 <400> 65

 Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg His Val Arg Pro Arg Val Thr Arg
 1 5 10 15

 Met Asp Val

 10 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> péptido Vectocell
 <400> 66

 Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg His Leu Gly Ser Gly
 1 5 10

 20 <210> 67
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido Vectocell

 30 <400> 67

 Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg
 1 5 10 15

 35 <210> 68
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> péptido Vectocell
 <400> 68

 Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg
 1 5 10 15

 Arg Glu Arg Gln Ser Arg
 20

 45 <210> 69
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50

<220>

<223> transportador Wr-T

<220>

<221> variante

<222> (22)..(29)

<223> /SUSTITUIR= enantiómero D de arginina

<400> 69

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Trp Thr Glu Trp
 1 5 10 15

Ser Gln Gly Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R7

<400> 70

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido TAT de VIH

<400> 71

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R8

<400> 72

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> RII
 <400> 73
 5
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> QSR8
 15
 <400> 74
 Gln Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> NLS
 25
 <400> 75
 Arg Lys Arg His
 1
 30
 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> NLS del antígeno T grande de SV40
 40
 <400> 76
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5
 <210> 77
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> NLS de nucleoplasmina
 50
 <400> 77
 Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 55

5 <210> 78
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia consenso de NLS
 10 <220>
 <221> variante
 <222> (2) .. (2)
 <223> /SUSTITUIR= "Arg" o "Lys"
 15 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 <223> /SUSTITUIR= cualquier aminoácido
 20 <220>
 <221> variante
 <222> (4) .. (4)
 <223> /SUSTITUIR= "Arg" o "Lys"
 25 <400> 78
 Lys Xaa Xaa Xaa
 1
 30 <210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> variante de NLS
 40 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 <223> /SUSTITUIR= cualquier aminoácido
 45 <220>
 <221> repetir
 <222> (3)..(3)
 <223> X puede ser de 5 a 20 restos
 <400> 79
 Lys Arg Xaa Lys Lys Lys Lys
 1 5
 50 <210> 80
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> variante de NLS
 60 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(12)
 <223> /SUSTITUIR= cualquier aminoácido

<400> 80

Lys Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

5 <210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> variante de NLS

<220>
<221> variante
15 <222> (5)..(5)
<223> /SUSTITUIR= cualquier aminoácido

<220>
<221> repetir
20 <222> (5)..(5)
<223> 2 a 10

<220>
<221> repetir
25 <222> (5)..(5)
<223> X puede ser de 2 a 10 restos

<400> 81

Arg Lys Arg His Xaa Lys Lys
1 5

30

35 <210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de NLS

40 <220>
<221> variante
<222> (5).. (6)
<223> /SUSTITUIR= cualquier aminoácido

45 <400> 82

Arg Lys Arg His Xaa Xaa Lys Lys
1 5

50 <210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> variante de NLS

<400> 83

		Arg Lys Arg His Ile Ile Lys Lys
		1 5
5	<210> 84 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> NLS de pncoproteína c-myc <400> 84	
		Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
		1 5
15	<210> 85 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Agrupamiento de aminoácidos básicos de NLS <400> 85	
		Lys Lys Lys Lys
25		1
30	<210> 86 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> variante de NLS	
35	<400> 86	
		Pro Ala Ala Lys Lys Lys Leu Asp
		1 5
40	<210> 87 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> variante de NLS <400> 87	
		Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu
		1 5
50	<210> 88 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220>	

<223> variante de NLS

<400> 88

5 Lys Lys Lys Arg Lys
 1 5

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de NLS

15 <400> 89

 Lys Lys Lys Arg Val Lys
 1 5

20 <210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> variante de NLS

<400> 90

 Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu
 1 5

30 <210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> variante de NLS

40 <400> 91

 Arg Lys Lys Arg Lys Val Leu
 1 5

45 <210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> péptido derivado de TAT de VIH

<400> 92

 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gln
 1 5 10

55 <210> 93
<211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> derivado de la proteína de SV40

 <400> 93

 Lys Lys Lys Arg Lys
 1 5
 10
 <210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Conector

 <400> 94
 20
 Ile Ile Leu Val Ile
 1 5

 <210> 95
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Conector
 30
 <400> 95

 Ile Ile Leu Val Ile Ile Ile
 1 5
 35
 <210> 96
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligopeptídico APIM

 <400> 96

 Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Arg Ile Leu Val Ala Thr Lys
 1 5 10
 45
 <210> 97
 <211> 20
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto oligopeptídico APIM
 55
 <400> 97

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Arg Ile Leu Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5 10 15

Ala Thr Lys Gly
20

<210> 98

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR2

<220>

<221> mod_res

<222> (34)..(34)

<223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

<400> 98

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Gly Ala Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys
1 5 10 15

Val Leu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp
20 25 30

Lys Lys

<210> 99

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR27

<220>

<221> mod_res

<222> (28)..(28)

<223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

<400> 99

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Gly Ala Trp Lys Lys Lys Arg Val Lys
1 5 10 15

Ile Ile Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20 25

<210> 100

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR26-0

<400> 100

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Gly Ala Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
1 5 10 15

Ile Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
20 25

5 <210> 101
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> MDR26-1

<220>
<221> mod_res
15 <222> (27)..(27)
<223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

<400> 101

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Gly Ala Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
1 5 10 15

Ile Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20 25

20 <210> 102
<211> 27
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> MDR26-2

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

35 <400> 102

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Arg Ile Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
1 5 10 15

Ile Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20 25

40 <210> 103
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> MDR26-3

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

5 <400> 103

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Trp Trp Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
 1 5 10 15

Ile Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
 20 25

10 <210> 104
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> MDR26-4

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 20 <223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

<400> 104

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Trp Trp Arg Lys Arg His Ile Ile Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
 20 25

25 <210> 105
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> MDR26-7

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

<400> 105

40 Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Arg Ile Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
 1 5 10 15

Ile Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys

20

25

45 <210> 106
 <211> 33
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR26-8

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

10

<400> 106

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Arg Ile Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
1 5 10 15

Ile Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
20 25 30

Lys

15

<210> 107

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> MDR26-10

<220>

<221> MOD_RES

25

<222> (28)..(28)

<223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

<400> 107

Met Asp Arg Phe Leu Val Lys Gly Ala Trp Arg Lys Arg His Ile Ile
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20 25

30

<210> 108

<211> 26

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR26-72

40

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Acoplado a fluoresceína

45

<400> 108

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys
20 25

<210> 109
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MDR26-32

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Acoplado a fluoresceína

<400> 109

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20

<210> 110
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MDR26-42

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> Acoplado a fluoresceína

<400> 110

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Trp Arg Lys Arg His Ile Arg Lys Lys
1 5 10 15

Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20

<210> 111
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MDR24-43

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)

<223> Acoplado a fluoresceína-5-isotiocianato

<400> 111

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Gly Ala Trp Arg Lys Arg His Ile Arg
1 5 10 15

Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys
20 25

<210> 112

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR26-72-0

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

<400> 112

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25

<210> 113

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR26-72-A

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

<400> 113

Met Asp Arg Ala Leu Val Lys Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25

<210> 114

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDR26-72-011

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 5 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 10 <223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

 <400> 114

 Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys
 20
 15
 <210> 115
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> MDR26-01

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 25 <223> ACETILACIÓN

 <400> 115
 30
 Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 20
 <210> 116
 <211> 35
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> MDR34
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 45 <223> 5-Carboxifluoresceína acoplada mediante ácido aminohexanoico

 <400> 116

ES 2 912 122 T3

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys Arg Ile Trp Lys Lys Lys Arg Lys Ile
1 5 10 15

Ile Arg Trp Leu Val Lys Trp Trp Trp Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
20 25 30

Arg Arg Lys
35

<210> 117
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RI-MDR26-3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Acoplado a fluoresceína-5-isotiocianato

<400> 117

Lys Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Ile Ile Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

Lys Trp Trp Trp Lys Val Leu Trp Arg Asp Met
20 25

<210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de APIM

<400> 118

Met Asp Arg Trp Leu Val Lys

1 5

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de APIM

<400> 119

Met Asp Arg Phe Leu Val Lys
1 5

<210> 120

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de APIM

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

 <400> 120

15

	Met	Asp	Arg	Trp	Leu	Val	Lys
	1				5		

<210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de APIM

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

30

<400> 121

35

	Met	Asp	Arg	Ala	Leu	Val	Lys
	1				5		

<210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de APIM

 <400> 122

45

	Lys	Val	Leu	Trp	Arg	Asp	Met
	1				5		

<210> 123
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> NLS

55

<400> 123

	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Leu
	1				5			

<210> 124
 <211> 6

	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> NLS#	
	<400> 124	
		Lys Lys Lys Arg Val Lys
		1 5
10	<210> 125	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> NLS	
	<400> 125	
20		Lys Lys Lys Arg Lys
		1 5
	<210> 126	
	<211> 8	
25	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> NLS	
30	<400> 126	
		Arg Lys Arg His Ile Ile Lys Lys
		1 5
35	<210> 127	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> NLS	
	<400> 127	
		Arg Lys Arg His
		1
45	<210> 128	
	<211> 5	
	<212> PRT	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> NLS	
55	<400> 128	
		Lys Arg Lys Lys Lys
		1 5

5 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CPP

 10 <400> 129

 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
 1 5 10 15

 15 <210> 130
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> CPP

 <400> 130

 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

 25 <210> 131
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> CPP

 <400> 131

 35 <210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CPP

 40 <400> 132

 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

 45 <210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> CPP

 <400> 133

ES 2 912 122 T3

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

5 <210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 2a Secuencia de APIM

<400> 134

Arg Trp Leu Val Lys
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto oligopeptídico que comprende un motivo de interacción con el PCNA, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho compuesto oligopeptídico, para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de un trastorno neoplásico, inflamación, un trastorno autoinmunitario, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno hiperproliferativo inducido víricamente, un trastorno mielodisplásico o un trastorno mieloproliferativo, en el que el motivo de interacción con el PCNA es [R/K]-[W/F/Y]-[L/I/V/A/M]-[V/L/I/A/M]-[K/R] (SEQ ID NO: 28), en el que el compuesto oligopeptídico tiene menos de 70 subunidades y comprende un péptido de penetración celular que comprende un oligómero de 5 a 20 aminoácidos básicos.
2. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de la reivindicación 1, en el que el trastorno neoplásico es cáncer.
3. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de la reivindicación 2, en el que dicho cáncer se selecciona de cáncer de vejiga, un cáncer hematológico o cáncer de próstata.
4. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de la reivindicación 3, en el que el cáncer hematológico es mieloma múltiple o leucemia.
5. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el motivo de interacción con el PCNA se selecciona de:
 - [K/R]-[Y/W]-[L/I/V/A/M]-[L/I/V/A/M]-[K/R] (SEQ ID NO: 29);
 - [K/R]-[F/Y/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] (SEQ ID NO: 30);
 - [K/R]-[Y/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] (SEQ ID NO: 31);
 - [K/R]-[F/W]-[L/I/V/A/M]-[L/I/V/A/M]-[K/R] (SEQ ID NO: 32);
 - [K/R]-[F/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] (SEQ ID NO: 33);
 - [K/R]-[F/W]-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 34);
 - [K/R]-[F/Y/W]-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 35);
 - [K/R]-[Y/W]-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 36); o
 - [K/R]-F-[L/I/V]-[L/I/V]-[K/R] (SEQ ID NO: 37).
6. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el motivo de interacción con el PCNA se selecciona de una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 18, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26.
7. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia de señalización de penetración en la célula comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 55, 56, 62, 63, 70-74, 131 y 133.
8. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el compuesto comprende además una secuencia de señalización de localización nuclear.
9. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de la reivindicación 8, en el que dicha secuencia de señalización de localización nuclear comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 75-85, 87-90 y 128.
10. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho compuesto oligopeptídico y/o molécula de ácido nucleico se usan junto con, simultáneamente con, por separado de o secuencialmente con, un agente citostático o radioterapia.
11. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de la reivindicación 10, en el que dicho agente citostático (i) se selecciona entre actinomicina D, BCNU (carmustina), carboplatino, CCNU, campotecina (CPT), cantaridina, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, DTIC, epirubicina, etopósido, gefinitib, gemcitabina, ifosamida irinotecan, ionomicina, melfalano, metotrexato, mitomicina C (MMC), mitozantronmercaptopurina, oxaliplatino, paclitaxel (taxol), inhibidor de la PARP-1, taxotere, temozolomida (TZM), tenipósido, topotecan, treosulfano vinorelbina, vincristina, vinblastina, 5-azacitidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina y 5-fluorouracilo; o (ii) es un agente alquilante.
12. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico se proporcionan en una composición farmacéutica junto con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. El compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico para su uso de la reivindicación 12, en el que la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para administración oral, parenteral, tópica, rectal,

genital, subcutánea, transuretral, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intramuscular y/o intravenosa, y/o para una administración por inhalación.

Figura 1

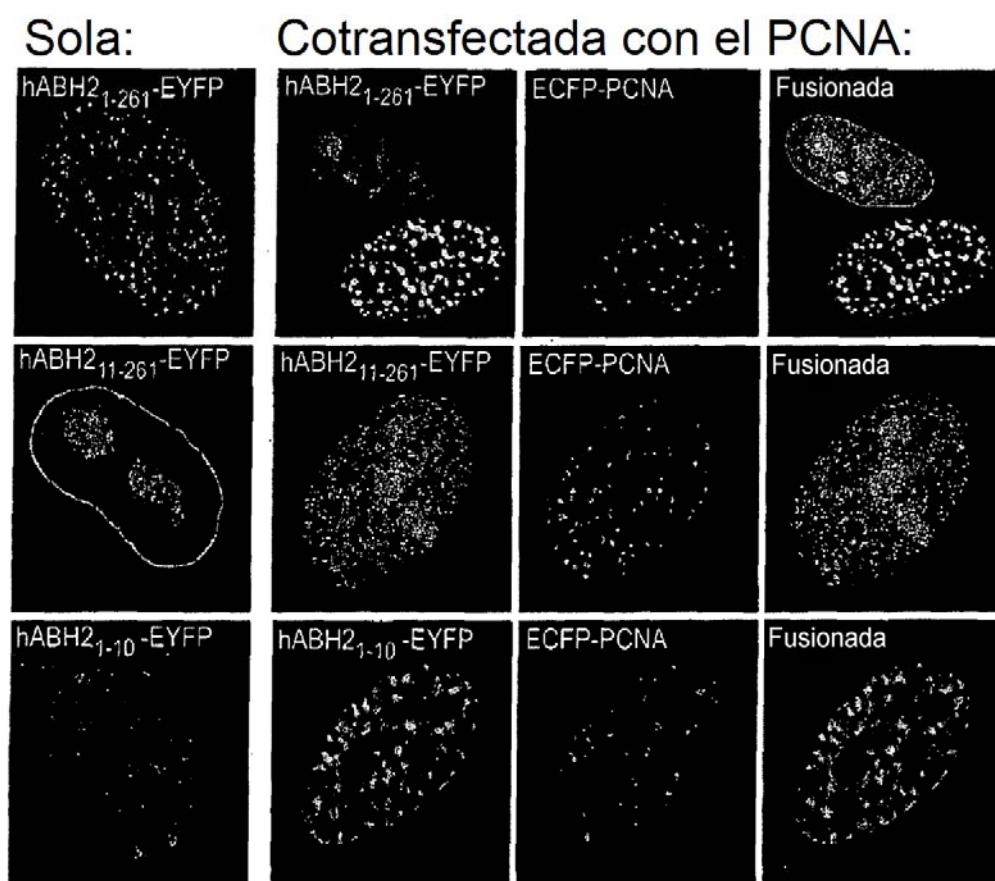


Figura 2

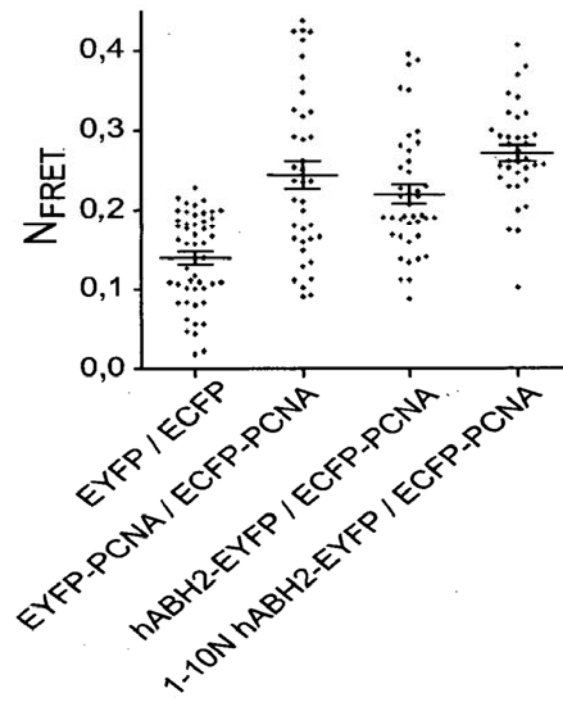


Figura 3

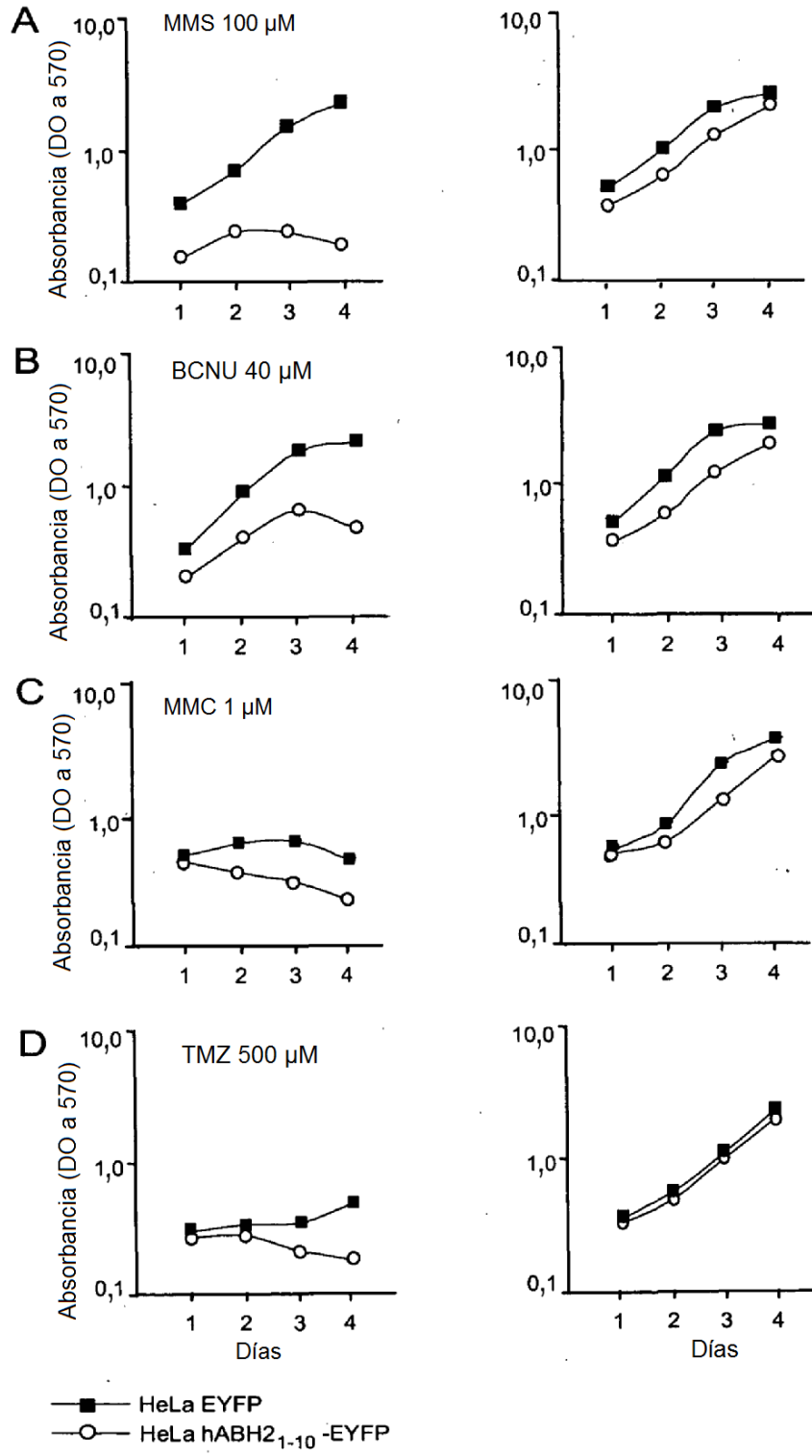


Figura 4

Homólogo 2 de la AlkB		APIM									
<i>Homo sapiens</i> /1-10	M	D	R	F	L	V	K	G	A	Q	
<i>Bos taurus</i> /1-10	M	D	R	F	L	V	K	G	A	V	
<i>Rattus norvegicus</i> /1-10	M	D	R	F	L	V	R	P	D	R	
<i>Mus musculus</i> /1-10	M	D	K	F	L	V	R	P	D	L	
<i>Gallus gallus</i> /1-10	M	D	R	F	V	V	K	R	S	A	
<i>Strongy. purp.</i> /1-10	M	D	K	F	I	I	K	R	K	K	

Figura 5

Proteína similar al factor de elongación TFIIIS

TFIIIS-L

Homo sapiens/1-10*Mus musculus*/1-10*Gallus gallus*/1-10*Xenopus tropicalis*/1-10

APIM

M	D	K	F	V	I	R	T	P	R
M	D	K	F	V	I	R	T	P	R
M	E	R	F	V	V	R	R	A	R
M	D	R	F	V	I	R	K	Q	K

Factor de transcripción general II

TFII-I, isoforma γ *Homo sapiens*/428-437*Mus musculus*/428-437*Xenopus laevis*/369-378

R	I	R	F	V	I	K	K	H	E
R	I	R	F	V	I	K	K	H	E
R	I	R	F	V	I	K	K	P	E

Homo sapiens/533-542*Mus musculus*/533-542*Xenopus laevis*/473-482

R	I	K	F	V	I	K	R	P	E
R	I	K	F	V	I	K	R	P	E
R	I	K	F	V	I	K	K	P	E

Homo sapiens/638-647*Mus musculus*/638-647*Xenopus laevis*/577-586

K	I	K	F	V	V	K	K	P	E
K	I	K	F	V	V	K	K	P	E
K	I	K	F	I	V	K	K	P	H

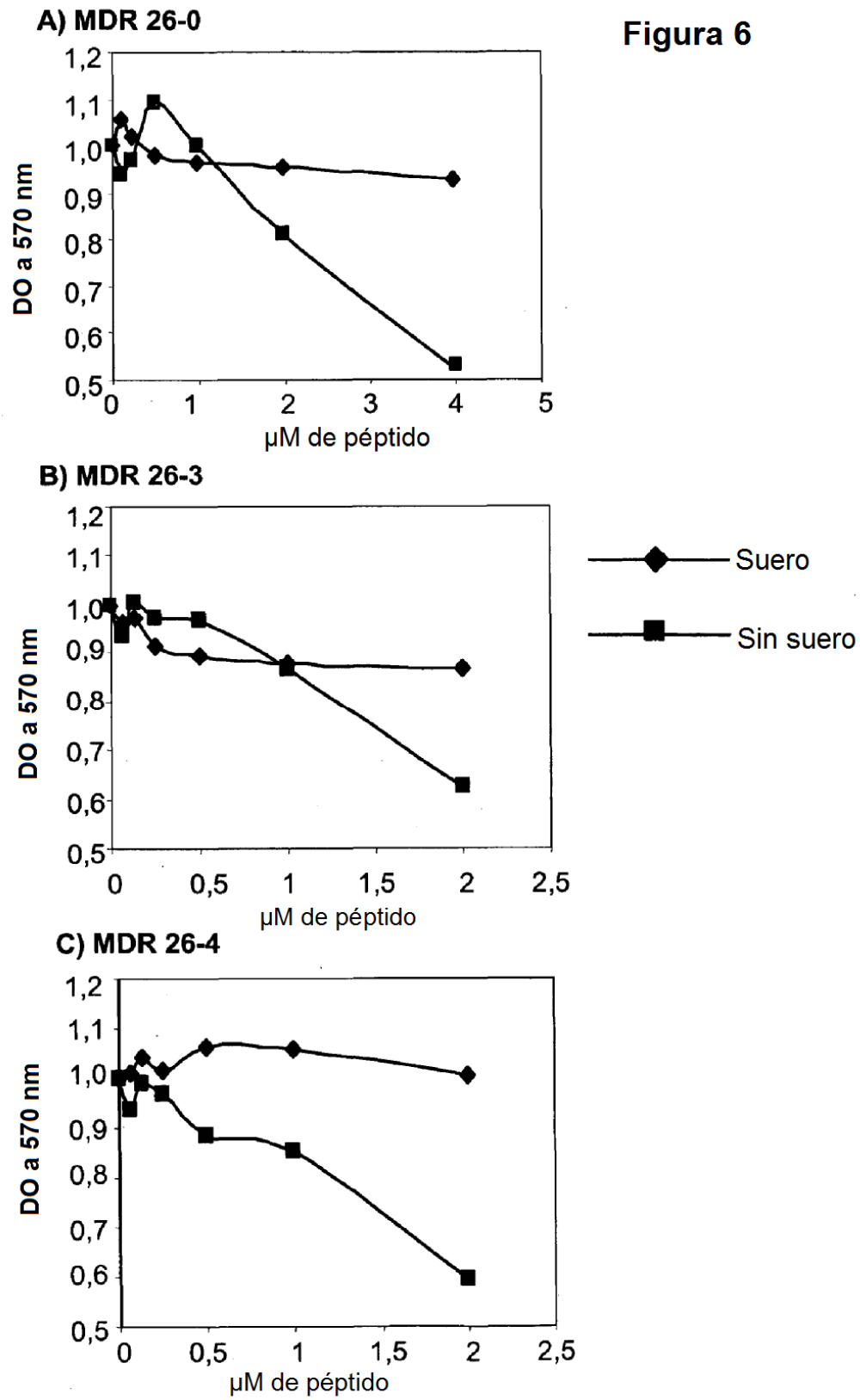
Homo sapiens/800-809*Mus musculus*/800-809*Xenopus laevis*/732-741

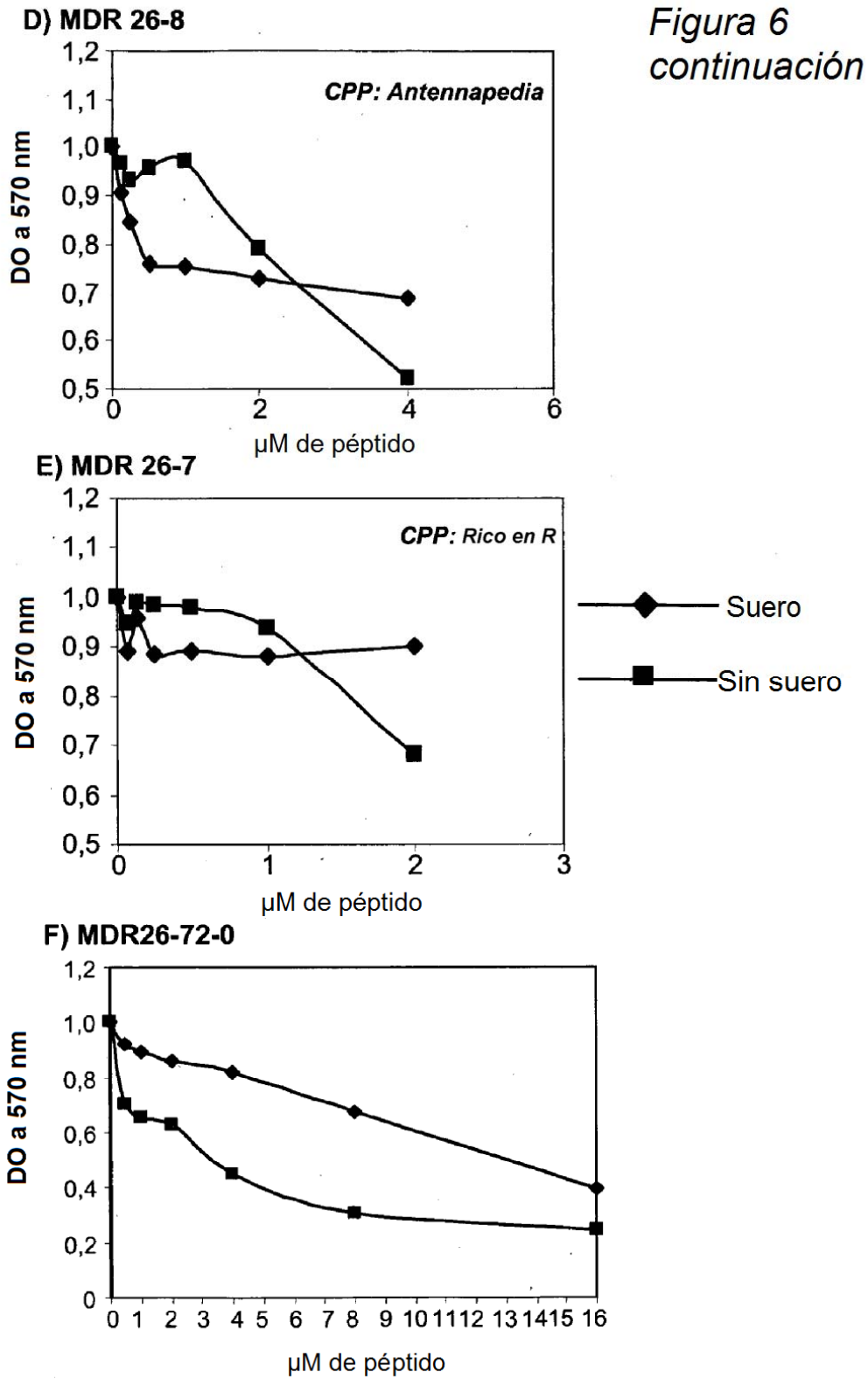
K	I	K	F	I	I	K	K	P	E
K	I	K	F	I	I	K	K	P	E
K	I	K	F	V	I	K	K	P	E

Topoisomerasa II alfa de ADN

Topo II α *Homo sapiens*/965-974*Mus musculus*/964-973*Gallus gallus*/966-975*Xenopus laevis*/963-972

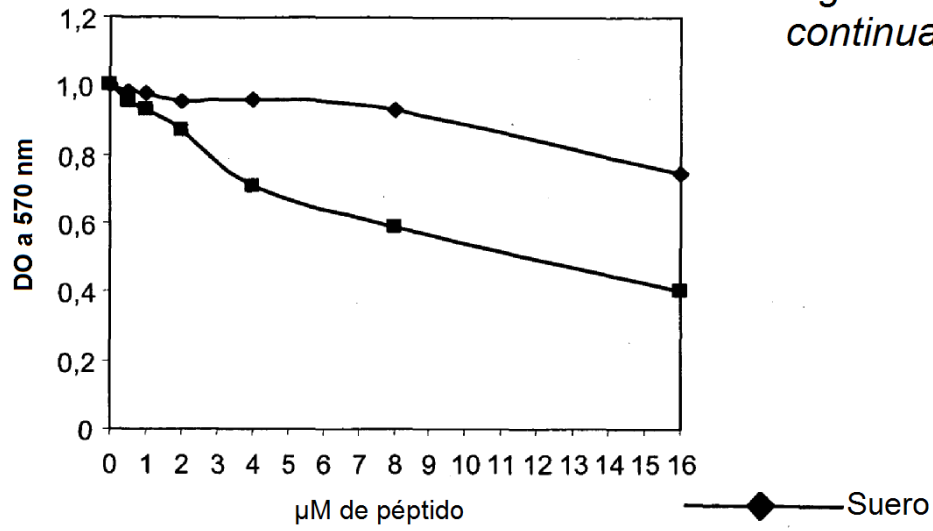
T	V	K	F	V	V	K	M	T	E
T	V	K	F	V	I	K	M	T	E
T	V	K	F	V	V	K	M	S	E
T	V	R	F	L	V	K	M	T	E





G) MDR26-72-01

*Figura 6
continuación*



H) MDR-34

