

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 027**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2014 PCT/US2014/066619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15080943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2014 E 14866083 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3074049**

54 Título: **Nuevas composiciones penetrantes de células y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:
26.11.2013 US 201361908963 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2021

73 Titular/es:
**YALE UNIVERSITY (100.0%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06511, US**

72 Inventor/es:
**SESSA, WILLIAM C. y
GIORDANO, FRANK J.**

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 806 027 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

Nuevas composiciones penetrantes de células y métodos de uso de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

La membrana celular (también conocida como membrana plasmática o membrana citoplasmática) es una membrana biológica que separa el interior de la célula del ambiente exterior, protegiendo la célula de su entorno. La membrana comprende una bicapa de fosfolípidos con proteínas incrustadas, y está involucrada en procesos celulares como la adhesión celular, la conductividad iónica y la señalización celular.

La membrana celular controla el movimiento de sustancias dentro y fuera de las células y es selectivamente permeable a iones y moléculas orgánicas. El movimiento de sustancias a través de la membrana puede ser pasivo (es decir, que ocurre sin el aporte de energía celular) o activo (es decir, que requiere que la célula gaste energía en su transporte). La membrana celular funciona así como un filtro selectivo, empleando mecanismos de transporte como la ósmosis pasiva y la difusión, el transporte de canales de proteínas transmembrana, la endocitosis y la exocitosis.

La administración intracelular de compuestos biológicamente activos es un desafío porque la membrana celular es notablemente impermeable a los compuestos polares extracelulares. Por lo tanto, hay mucho interés en identificar nuevos péptidos permeables en las células ("CPP") que puedan actuar como "caballos de Troya" para transportar moléculas de carga dentro de las células vivas. Los CPP se han empleado en la administración intracelular de oligonucleótidos (Astriab-Fisher et al., 2000, *Biochem. Pharmacol.* 60:83-90; Eguchi et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26204-26210), plásmidos (Morris et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:3510-3517), virus (Gratton et al., 2003, *Nat. Med.* 9:357-362), péptidos (Gratton et al., 2003, *Nat. Med.* 9:357-362; Soomets et al., 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1.467:165-176) y fluoróforos (Bucci et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1362-1367). El dominio Antennapedia ("AP"; un péptido de 16 aminoácidos, que es un factor de transcripción de *Drosophila*), así como el transactivador de la transcripción del VIH ("TAT"; 15 aminoácidos) se encuentran entre los primeros CPP descritos, junto con las secuencias de CPP descritas más recientemente, tales como poli-Arginina (Arg₇ o Arg₉) y C105Y (un péptido de 17 aminoácidos).

La capacidad de los CPP para translocar cargas en las células podría convertirlos en agentes de administración atractivos para los compuestos terapéuticos impermeables en las células. Sin embargo, el efecto terapéutico, la cinética, el perfil de seguridad y la especificidad de los CPP en seres humanos son todavía desconocidos. Se requieren nuevos CPP diseñados en función de la diana con mayores capacidades de internalización, mayor eficacia terapéutica y seguridad globales, eliminación/degradación del péptido mínima y elevada relación actividad terapéutica/coste.

Las caveolinas son proteínas de unión a colesterol que pueden regular las vías de transducción de la señal (Smart et al., 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19:7289-7304; Kurzchalia & Parton, 1999, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:424-431). Los estudios recientes se han centrado en su tráfico subcelular y la regulación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El NO derivado de la eNOS es necesario para el mantenimiento de la presión arterial sistémica, la remodelación vascular, la angiogénesis y la cicatrización de heridas (Huang et al., 1995, *Nature* 377:239-242; Murohara et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101:2567-2578; Rudic et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101:731-736; Lee et al., 1999, *Am. J. Physiol.* 277:H1600-1608). La eNOS puede interactuar físicamente con la caveolina-1 y la caveolina-3 uniéndose a su supuesto dominio de andamiaje ubicado entre los residuos 82-101 (Li et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:29182-29190), y esta interacción hace que la eNOS esté en su estado "menos activo" (García-Cardena et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:25437-25440; Ju et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:18522-18525; Michel et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:25907-25912). De acuerdo con el modelo de caveolina como regulador negativo de la eNOS, los péptidos derivados del dominio de andamiaje de la caveolina-1 alteran la unión de la eNOS a la caveolina e inhiben la actividad de la NOS de manera dependiente de la dosis *in vitro* (IC₅₀ = 1-3 μM) enlenteciendo el flujo electrónico desde la reductasa hasta el dominio oxigenasa de la NOS (García-Cardena et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:25437-25440; Ju et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:18522-18525; Ghosh et al., 1998, *J. Biol. Chem.* 273:22267-22271).

Lidington et al., *Am J Physiol Cell Physiol*, 289, 2005, C1437-C1447, se refiere al papel del receptor 2 activado por proteínasa y PKC-épsilon en la inducción mediada por trombina del factor acelerador de la descomposición en células endoteliales humanas y divulga un péptido inhibidor de la JNK con una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia RRPPR.

Collawn et al., *Molecular Immunology*, 26(11), 1989, 1069-1079, se refiere a los determinantes de la respuesta de linfocitos T específicos de citocromo C de paloma y divulga proteínas de fusión de un fragmento de citocromo C de paloma y un péptido que comprende la secuencia RRPPR.

El documento US 7 833 967 B2 se refiere a polipéptidos antimicrobianos sintéticos y divulga un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR.

El documento US 2009/226372 A1 se refiere a péptidos útiles para dirigir e internalizar moléculas en células y

divulga péptidos que comprenden la secuencia RRPPR.

5 Existe la necesidad en la técnica de identificar nuevas moléculas que penetren eficientemente en las membranas celulares. Dichas moléculas serían útiles para promover la administración de restos de carga, tales como agentes terapéuticos, ácidos nucleicos, péptidos, sacáridos, lípidos, liposomas y similares, a través de la membrana celular. La presente invención satisface esta necesidad insatisfecha.

Breve resumen de la invención

10 La invención es como se define en las reivindicaciones.

En determinadas realizaciones, el péptido de transporte consiste en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el péptido y/o la construcción de transporte es/son parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En determinadas realizaciones, el resto de carga está unido covalentemente al péptido de transporte a través de un enlazador o un enlace químico. En otras realizaciones, el enlazador comprende un enlace disulfuro, o el enlace químico entre el resto de carga y el péptido de transporte comprende un enlace disulfuro. Incluso en otras realizaciones, el resto de carga comprende un resto de péptido. Incluso en otras realizaciones, el resto de carga comprende un péptido o proteína. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N del resto de péptido del resto de carga. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo C del resto de péptido del resto de carga.

25 En determinadas realizaciones, el vector comprende además elementos de activación transcripcionales que permiten la expresión del ácido nucleico que codifica el péptido de transporte. En otras realizaciones, el vector comprende un ácido nucleico que codifica un resto de carga en el marco con el ácido nucleico que codifica el péptido de transporte. Incluso en otras realizaciones, el ácido nucleico es un vector que comprende (a) un ácido nucleico que codifica el péptido de transporte, y (b) un ácido nucleico que codifica un resto de carga en el marco con el ácido nucleico que codifica el péptido de transporte. Incluso en otras realizaciones, la célula hospedadora comprende además elementos de activación transcripcionales que permiten la expresión del ácido nucleico de (a) y el ácido nucleico de (b) en la célula hospedadora.

35 En determinadas realizaciones, el péptido de transporte se une a una célula diana y/o atraviesa una membrana celular. En otras realizaciones, la construcción de transporte se une a una célula diana y/o atraviesa una membrana celular. Incluso en otras realizaciones, la célula diana comprende al menos una seleccionada del grupo que consiste en una célula endotelial, célula cardíaca, célula inmunitaria, célula del músculo esquelético y célula cerebral. Incluso en otras realizaciones, la célula es de mamífero. Incluso en otras realizaciones, el mamífero es un ser humano.

40 En determinadas realizaciones, un compuesto y/o composición de la invención se administra al sujeto a través de al menos una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, transmucosal, tópica, transdérmica, intradérmica, subcutánea, oftálmica, intravítrea, subconjuntival, supracoroidal, intracameral, inhalatoria, intrabronquial, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intraduodenal, intravesical, parenteral, intratecal, intramuscular e intragástrica.

45 Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de realizaciones específicas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones específicas. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

55 La Fig. 1 es un gráfico que ilustra el enriquecimiento exponencial de fagos permeables en células durante la purificación por afinidad (biopanning). Los porcentajes de fagos recuperados de la Tabla 1 se representan gráficamente para las seis rondas de purificación por afinidad en células endoteliales ("CE"). La correlación exponencial se establece con un valor R^2 de 0,975.

Las Figs. 2A-2D son una serie de gráficos de barras que ilustran el hallazgo de que Endo5-Cav es más potente que AP-Cav para bloquear la liberación de NO inducida por VEGF. Fig. 2A: La Endo5-Cav bloqueó completamente la liberación de NO inducida por VEGF. Las BAEC cultivadas se trataron previamente durante 6 horas con los péptidos indicados (10^{-5} M) y se estimularon con VEGF (10^{-9} M) durante 30 min como se indica. *P < 0,05 en comparación con el vehículo, y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + VEGF. n=4 por triplicado. Fig. 2B: AP-Cav y Endo5-Cav mostraron un efecto dependiente de la dosis. Las BAEC cultivadas se trataron previamente con péptidos ($1-50 \times 10^{-6}$ M) durante 6 horas y se estimularon con VEGF como se ha descrito en la Fig. 2A. *P < 0,05 en comparación con el vehículo, y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + VEGF. n=4 por duplicado. Fig. 2C: AP-Cav y Endo5-Cav mostraron un efecto dependiente del tiempo. Las BAEC se trataron con péptidos (10^{-5} M) durante 1, 2, 4 o 6 horas, y se estimularon con VEGF como se ha descrito en la Fig. 2A. *P < 0,05 en comparación con el vehículo, y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + VEGF. n=4 por duplicado. Fig.

2D: La optimización tanto de la secuencia de penetración celular como del dominio Cav de AP-Cav condujo a un inhibidor de la eNOS más corto y más potente. La sustitución de AP por Endo5 y acortamiento de Cav (82-101) a CavAB (82-95) (Endo5-CavAB; 10^{-5} M) bloqueó completamente la liberación de NO inducida por VEGF, mientras que Endo5-CavAB (2×10^{-6} M), un péptido mucho más corto a una dosis menor, tuvo un efecto similar al AP-Cav (10^{-5} M).

Las Figs. 3A-3B ilustran el hallazgo de que la Endo5-Cav bloquea la extravasación del azul de Evans *in vivo*. Fig. 3A: El pretratamiento de ratones con AP-Cav (1 mg/kg) o Endo5-Cav (la misma dosis molar) durante 1 hora evitó el aumento inducido por el aceite de mostaza en la permeabilidad vascular (oreja derecha; 30 min), mientras que los péptidos de control no tuvieron ningún efecto significativo. Las orejas izquierdas se pintaron con aceite mineral solo (vehículo) y se consideraron como control de referencia. Los ratones fueron preinyectados con azul de Evans. *P < 0,05 en comparación con el péptido de control, y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + aceite de mostaza. n=6 u 8 por grupo por duplicado. Fig. 3B: Se ilustran valores representativos para los datos presentados en la Fig. 3A.

Las Figs. 4A-4B son una serie de gráficos que ilustran el hallazgo de que Endo5 se internaliza más rápido que AP en células endoteliales cultivadas. Fig. 4A: Se realizaron lecturas de fluorescencia para concentraciones similares de rodamina-AP (rhod-AP) y carboxifluoresceína-Endo5 (cFluo-Endo5) disueltas en la misma solución de lisis celular utilizada en la Fig. 4B para confirmar la linealidad entre la concentración de péptido en la solución y los valores de fluorescencia. Los péptidos se usaron por separado para evitar interferencias. Fig. 4B: La tasa de internalización de la carboxifluoresceína-Endo5 es mayor que la de rodamina-AP. Las BAEC cultivadas se incubaron durante 1, 2, 4 o 6 horas con péptidos individuales, se lavaron con ácido, se aclararon, se tripsinizaron, se lisaron y se determinó la fluorescencia interna total y se convirtió en moles de péptidos por 10^6 usando una curva estándar. Las células incubadas con péptidos durante 5 min y tratadas como se ha descrito se usaron como fondo para la tinción no internalizada.

Las Figs. 5A-5C ilustran el hallazgo de que la internalización de Endo5 y AP usa rutas celulares superpuestas en células endoteliales. Fig. 5A: Las HUVEC cultivadas se trataron con carboxifluoresceína-Endo5 (verde) o rodamina-AP (rojo; 10^{-5} M) durante 1 hora (pulso), se aclararon y se tomaron imágenes vivas en células no fijadas usando un microscopio de epifluorescencia. Obsérvese la tinción punteada con ambos péptidos y la ausencia de tinción nuclear (zona oscura de forma ovalada). Las imágenes fusionadas mostraron localización (amarillo) entre ambos péptidos. Se muestran células representativas. Fig. 5B: Después del tratamiento descrito en la Fig. 5A, la localización del péptido se siguió durante dos horas en HUVEC vivas y se visualizó. La colocalización (amarillo) entre ambos péptidos todavía era observable. Fig. 5C: Endo5 y AP impidieron la inhibición por AP-Cav y Endo5-Cav de la liberación de NO inducida por VEGF. Las BAEC cultivadas se trataron previamente con AP o Endo5 (5×10^{-5} M) y se incubaron durante 6 h con AP-Cav o Endo5-Cav (10^{-5} M) y se estimularon con VEGF como se ha descrito en la Fig. 2. *P < 0,05 en comparación con vehículo n=6 por grupo por triplicado.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere en parte a la identificación inesperada de Endo5 (RRPPR; SEQ ID NO: 1), un péptido corto de cinco aminoácidos, como un péptido permeable en las células (CPP).

En determinadas realizaciones, Endo5 es un péptido de transporte que atraviesa la membrana celular. En otras realizaciones, una vez que el resto de carga se une a Endo5, la construcción resultante atraviesa la membrana celular de manera más eficiente que el propio resto de carga. En otras realizaciones, el resto de carga está unido al péptido de transporte a través de un enlazador covalente o no covalente.

Como se demuestra en el presente documento, Endo5, un pentapéptido corto, se aisló inesperadamente usando un enfoque basado en una biblioteca de presentación de fagos. Endo5 fue seleccionado por su capacidad para aumentar la internalización de fagos en células endoteliales humanas. Los análisis funcionales revelaron que Endo5-Cav era más potente que AP-Cav en inhibir la liberación de óxido nítrico inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en las células endoteliales *in vitro* y la permeabilidad *in vivo*. Los estudios farmacocinéticos y de competencia mostraron que Endo5 fue internalizado por las células endoteliales a un ritmo mayor que AP, y que las actividades de Endo5-Cav fueron inhibidas competitivamente por AP, proporcionando evidencia de la similitud de las vías de captación de Endo5 y AP. Como lo respaldan los datos presentados en el presente documento, Endo5 no es solo la secuencia de CPP más corta conocida en el momento de la invención, sino también el primer CPP diseñado específicamente para altas tasas de internalización en células endoteliales.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o análisis de la invención también se puede usar cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen métodos y materiales no limitativos.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos

uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más específicamente $\pm 5\%$, aún más específicamente $\pm 1\%$, e incluso más específicamente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

Una enfermedad o trastorno se "alivia" si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que un paciente experimenta dicho síntoma, o ambos.

La expresión "variante de la secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente 70 % de homología, al menos aproximadamente 80 % de homología, al menos aproximadamente 90 % de homología, al menos aproximadamente 95 % de homología, al menos aproximadamente 96 % de homología, al menos aproximadamente 97 % de homología, al menos aproximadamente 98 % de homología, o al menos aproximadamente 99 % de homología con el polipéptido nativo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "AP" se refiere al homeodominio Antennapedia (un péptido de 16 aminoácidos que es un factor de transcripción de *Drosophila*), el cual es el péptido de SEQ ID NO: 2 o una sal o solvato del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "BAEC" se refiere a célula(s) endotelial(es) de aorta bovina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unión" se refiere a la adherencia de moléculas entre sí, tales como, pero sin limitación, las enzimas a los sustratos, los anticuerpos a los antígenos, las hebras de ADN a sus hebras complementarias. La unión se produce porque la forma y la naturaleza química de las partes de las superficies de las moléculas son complementarias. Un modelo común es el de la "cerradura y llave" utilizado para describir cómo las enzimas se ajustan alrededor de su sustrato. En un ejemplo no limitativo, la unión de la proteína caveolina puede producirse en uno o más dominios de la eNOS, tales como, pero sin limitación, el dominio oxigenasa de la eNOS y/o el dominio reductasa de la eNOS.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "dominio de andamiaje de la caveolina" se refiere a los dominios incluidos los posibles dominios de andamiaje de cualquier proteína caveolina. Por tanto, la expresión como se utiliza en el presente documento no se limita a posibles dominios de andamiaje. La secuencia completa del ARNm de la Cav-1 humana puede encontrarse en GenBank N.º de acceso BAG70230.1 (SEQ ID NO: 3). El código de la proteína completa de la Cav-3 humana puede encontrarse en GenBank N.º de acceso AAC39758.1 (SEQ ID NO: 4).

Ejemplos de dominios de andamiaje de caveolina incluyen, pero sin limitación, los siguientes: aminoácidos 82-101 de la caveolina-1 humana (⁸²DGIWKASFTTFTVTKYWFYR¹⁰¹) (SEQ ID NO: 5) o equivalentes de la misma; aminoácidos 82-95 de la caveolina-1 humana (⁸²DGIWKASFTTFTVT⁹⁵) (SEQ ID NO: 6) o equivalentes de la misma.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "variación conservadora" o "sustitución conservadora" como se usan en el presente documento se refieren a la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. No es probable que las variaciones o sustituciones conservadoras cambien la forma de la cadena peptídica. Los ejemplos de variaciones o sustituciones conservadoras, incluyen el reemplazo de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal donde el animal no puede mantener la homeostasis y donde si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose.

un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una parte de una molécula o estructura que comparte características fisicoquímicas comunes, tales como, pero sin limitación, dominios hidrófobos, polares, globulares y helicoidales o propiedades. Los ejemplos específicos de dominios de unión incluyen, pero sin limitación, dominios de unión a ADN y dominios de unión a ATP.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CE" se refiere a célula(s) endotelial(es).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Endo5" se refiere al péptido de SEQ ID NO: 1 o una sal o

solvato del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "azul de Evans" se refiere a cualquier sal o solvato de (6*E*,6'*E*)-6,6'-[[3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil]di(1*E*)hidrazin-2-il-1-iliden]bis(4-amino-5-oxo-5,6-dihidronaftalen-1,3-disulfonato).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "péptido heterólogo" se refiere a cualquier péptido, polipéptido o proteína cuya secuencia se selecciona de tal manera que el producto de la fusión de esta secuencia con el dominio de translocación de membrana tiene una secuencia diferente de la secuencia de tipo silvestre que flanquea cualquier dominio de translocación de membrana.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "dominio de translocación de membrana" se refiere a un péptido capaz de penetrar la membrana de una célula y que se usa para transportar péptidos unidos a una célula *in vivo*.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente", "individuo" o "sujeto" se refiere a un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tales como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, cánidos, felinos y murinos. En determinadas realizaciones, el paciente, individuo o sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" se refiere normalmente a polipéptidos cortos. La notación convencional se usa en el presente documento para representar secuencias de polipéptidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptidos es el extremo amino, y el extremo derecho de una secuencia de polipéptidos es el extremo carboxilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" o el término "composición" se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil dentro de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un paciente. Existen múltiples técnicas de administración de un compuesto en la técnica que incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, oral, aerosol, inhalatoria, rectal, vaginal, transdérmica, intranasal, bucal, sublingual, parenteral, intratecal, intragástrica, oftálmica, pulmonar y tópica. En determinadas realizaciones, las vías de administración incluyen la administración transdérmica, transmucosal (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, trans- y perivaginal), (intra)nasal y (trans)rectal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intrabronquial, inhalación, pleural, peritoneal, subcutánea, epidural, ótica, intraocular y/o tópica.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, tal como un vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, estabilizante, agente de dispersión, agente suspensor, diluyente, excipiente, agente espesante, disolvente o material encapsulante, implicados en llevar o transportar un compuesto útil dentro de la invención dentro o al paciente de modo que pueda realizar su función prevista. Normalmente, tales construcciones son llevadas o transportadas desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, incluido el compuesto útil dentro de la invención, y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agentes tensioactivos; ácido algínico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Tal como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye también cualquiera y todos los recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardadores de la absorción, y similares que son compatibles con la actividad del compuesto útil dentro de la invención, y son fisiológicamente aceptables para el paciente. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones. El "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir además una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto útil dentro de la invención. Otros ingredientes adicionales que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas usadas en la práctica de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo en Remington's Pharmaceutical

Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto administrado preparado a partir de ácidos y bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos, bases inorgánicas, ácidos orgánicos, bases inorgánicas, solvatos, hidratos y clatratos de los mismos. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen sulfato, hidrógenosulfato, ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico (incluyendo hidrógeno fosfato y dihidrógeno fosfato). Los ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse a partir de ácidos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y clases sulfónicas de ácidos orgánicos, ejemplos de los cuales son el ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzóico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, alginico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales metálicas incluyendo sales de amonio y sales de metales alcalinos, alcalinotérreos y de metales de transición tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas fabricadas a partir de aminas básicas tales como, por ejemplo, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaina. Todas estas sales pueden prepararse a partir del compuesto correspondiente haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o base apropiados con el compuesto.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "cantidad farmacéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de un agente para proporcionar el resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Un experto habitual en la materia puede determinar una cantidad terapéutica apropiada en cualquier caso individual utilizando experimentación de rutina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ANP" se refiere a un ácido nucleico peptídico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por restos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural, y análogos sintéticos de los mismos de origen no natural unidos mediante enlaces peptídicos (o amidas). Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automático.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir" o "prevención" significa que no se ha producido ningún trastorno o desarrollo de la enfermedad si no se había producido ninguno, o ningún otro trastorno o desarrollo de la enfermedad si ya se había producido el trastorno o la enfermedad. También se considera la capacidad de uno para prevenir algunos o todos los síntomas asociados con el trastorno o la enfermedad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" se refiere normalmente a polipéptidos grandes.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "RHMVEC" se refiere a célula(s) endotelial(es) microvasculares de corazón de rata.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un complejo entre una molécula y una molécula de disolvente, que puede existir en solución o en fase sólida. En determinadas realizaciones, el disolvente comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, metanol, etanol, *n*-propanol, 2-propanol, DMSO, DMF, éter etílico, acetona y piridina.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "construcción de transporte" se refiere a una construcción que atraviesa la membrana celular, donde la construcción comprende el péptido de transporte y al menos un resto de carga, donde el resto de carga atraviesa la membrana celular a una velocidad menor o en menor grado que la construcción de transporte. En determinadas realizaciones, el resto de carga se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico; péptido; proteína; oligosacárido; lípido; glucolípido; lipoproteína; compuesto de molécula pequeña; fármaco terapéutico; UV-vis, marcador fluorescente o radioactivo; agente de imagen; agente diagnóstico; agente profiláctico; liposoma y virus. En otras realizaciones, el resto de carga está unido al péptido de transporte a través de un enlazador covalente o no covalente.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "péptido de transporte" o "CPP" se refiere a cualquier péptido permeable en las células, que se define como un péptido capaz de permear y/o atravesar una membrana celular.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se define como la aplicación o

administración de un agente terapéutico, es decir, un compuesto útil dentro de la invención (solo o en combinación con otro agente farmacéutico), a un paciente, o aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislada de un paciente (p.ej., para diagnóstico o aplicaciones *ex vivo*), que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de una enfermedad o trastorno o el potencial de desarrollar una enfermedad o trastorno, con el propósito de curar, cicatrizar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno o el potencial de desarrollar la enfermedad o trastorno. Dichos tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, según el conocimiento obtenido en el campo de la farmacogenómica.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente divulgados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

La invención se refiere al hallazgo inesperado de que Endo5, un pentapéptido corto (RRPPR), es un CPP muy potente. Como se describe en el presente documento, Endo5 se aisló a través de un proceso de selección competitiva por su capacidad de ser internalizado rápidamente por las células endoteliales vasculares. Se demostró además que Endo5 aumenta la captación de carga por las células y aumenta la actividad terapéutica de una carga con la que se conjuga.

Como se describe en el presente documento, Endo5 fue el péptido generado al azar más enriquecido cuando se expresa en la superficie de los fagos seleccionados por la capacidad de ser rápidamente internalizados por las células endoteliales. La potencia máxima de Endo5-Cav para inhibir la liberación de NO inducida por VEGF fue mayor que la de AP-Cav en una base molar similar. Además, a pesar de su tamaño más pequeño (Endo5 es un péptido de 5 aminoácidos frente a AP que es un péptido 16 aminoácidos), la tasa de captación de Endo5 fue tres veces mayor que la de AP. Se descubrió que Endo5-Cav era más potente que AP-Cav para inhibir la permeabilidad vascular *in vivo*.

Mecanicamente, las vías celulares implicadas en la captación de Endo5 parecen similares a las de AP. Esto está respaldado por los siguientes hallazgos: co-localización significativa entre Endo5 y AP durante la endocitosis inicial y la distribución intracelular; la inhibición competitiva del efecto Endo5-Cav por AP, y la inhibición competitiva de la actividad AP-Cav por Endo5. Los hallazgos descritos en el presente documento proporcionan evidencia de que Endo5 tiene mayores capacidades de "eficiencia de internalización por aminoácido" en comparación con el AP bien establecido.

La justificación para diseñar un CPP potente para una célula endotelial reside no solo en las diversas enfermedades caracterizadas por una actividad celular endotelial aberrante, sino también por la localización estratégica de las células endoteliales entre la sangre y los tejidos subyacentes. Después de la absorción, la distribución del fármaco a través del compartimento vascular puede verse afectada rápidamente por la eliminación y la degradación. Estos mecanismos normales de inactivación de fármacos pueden compensarse mediante una rápida internalización en el sitio de acción. La evidencia de la magnitud de la internalización de Endo5 en las células endoteliales, en comparación con el conjunto de CPP generado aleatoriamente que el sistema actual permite probar, se ilustra por su capacidad para promover la captación de fagos en el sistema de selección de T7. Este sistema favorece la captación rápida exclusivamente a través de la unión de alta afinidad a las células endoteliales, ya que permite la expresión en la superficie de menos de una copia de péptido por fago. En determinadas realizaciones, Endo5 es el primer CPP diseñado específicamente para una elevada internalización de células endoteliales a través del enfoque de selección competitiva.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, la distribución intracelular de cargas hacia su diana puede ser, al menos parcialmente, independiente de la secuencia de CPP basado en el hecho de que Cav fusionada con dos CPP completamente diferentes (Endo5 o AP) atenuaba la actividad de la eNOS, inhibía la permeabilidad vascular y se co-localizaba después de un "seguimiento" de dos horas. Además, es posible que Endo5, así como otros CPP, puedan permitir varias vías de salida desde los orgánulos de internalización y/o dirigir la localización intracelular de las moléculas de carga de manera diferente. Sin embargo, la diferencia en la tasa de captación entre Endo5 y AP es el mecanismo probable que justifica la diferencia de potencia entre Endo5-Cav y AP-Cav. Esto también está respaldado por los datos que documentan la localización similar de Endo5 y AP en células vivas. Por otro lado, el aumento de la potencia de Cav cuando se fusiona con Endo5 y la casi saturación del efecto AP-Cav sobre la actividad de eNOS a altas dosis sugieren que el efecto AP-Cav podría estar limitado por una tasa de internalización superpuesta y eliminación/degradación en lugar de por una limitación del farmacóforo (Cav). Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, esto pone de relieve el interés en identificar secuencias de CPP altamente potentes, tales

como las secuencias que comprenden Endo5.

Composiciones

5 La divulgación incluye un péptido de transporte aislado que atraviesa una membrana celular. En determinadas realizaciones, el péptido, o una sal o solvato del mismo, comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, el péptido de transporte, o una sal o solvato del mismo, consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 1. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte, o una sal o solvato del mismo, consiste en la SEQ ID NO: 1. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte se une a una célula diana o atraviesa una
10 membrana celular. Incluso en otras realizaciones, la célula comprende una célula endotelial, célula cardíaca, célula inmunitaria, célula del músculo esquelético o célula cerebral. Incluso en otras realizaciones, la célula consiste en una célula endotelial, célula cardíaca, célula inmunitaria, célula del músculo esquelético o célula cerebral.

15 También se divulga una composición farmacéutica que comprende un péptido de transporte que comprende la SEQ ID NO: 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, las composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En determinadas realizaciones, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-6.

El resto de carga se une al péptido de transporte para formar la construcción de transporte de la presente invención. El péptido de transporte y el resto de carga están unidos de tal manera que permanecen unidos en las condiciones en las que se utiliza la construcción de transporte (p.ej., en condiciones en las cuales la construcción de transporte se administra a un individuo). En determinadas realizaciones, el resto de carga está unido covalentemente al péptido de transporte a través de un enlazador o un enlace químico. En otras realizaciones, el enlazador comprende un
25 enlace disulfuro, o el enlace químico entre el resto de carga y el péptido de transporte comprende un enlace disulfuro. Incluso en otras realizaciones, el resto de carga comprende un resto de péptido. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N del resto de péptido del resto de carga. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo C del resto de péptido del resto de carga. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N y al extremo C del resto de péptido del resto de carga. Como alternativa, el péptido de transporte y el resto de carga se combinan a través de un enlace no covalente, tal como interacción electrostática y/o hidrófoba.
35

En determinadas realizaciones, los péptidos de la presente invención pueden obtenerse de fuentes existentes en la naturaleza o pueden producirse usando técnicas conocidas, tales como síntesis química o métodos de ingeniería genética (por ejemplo, tecnología de ADN o ARN recombinante). En otras realizaciones, los péptidos de la invención pueden prepararse usando métodos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (o fase de solución), tal como se conoce en la técnica. Además, el ADN que codifica estos péptidos puede sintetizarse usando instrumentación de
40 síntesis de oligonucleótidos disponible comercialmente y producirse de manera recombinante usando sistemas de producción recombinante estándar.

45 En determinadas realizaciones, los péptidos aislados de la presente invención están relativamente libres de péptidos no relacionados, así como de polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otro material celular contaminante que normalmente están asociados con el péptido en una célula o que están asociados con el péptido en un biblioteca.

Las construcciones de transporte de la invención son útiles para la administración de restos de carga a través de la membrana celular. Las construcciones de transporte de la invención son útiles también para la administración de restos de carga a una célula diana (por ejemplo, un tipo de célula específico, tal como pero sin limitación una célula cardíaca, una célula endotelial o una célula inmunitaria) y para la administración de restos de carga a una célula objetivo y/o a través de la membrana de la célula diana.
50

Los péptidos de transporte de la presente invención tienen la capacidad de atravesar la membrana celular de una célula (p.ej., se internalizan en la célula). Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la invención, un péptido de transporte se transloca desde el entorno extracelular de una célula, penetra en la bicapa lipídica de la membrana celular y atraviesa la membrana celular hasta el entorno intracelular de la célula. En otras realizaciones, los péptidos de transporte se unen y atraviesan la membrana celular de una célula diana. Incluso en otras realizaciones, los péptidos de transporte de la presente invención se unen a una célula diana. Una célula diana es un tipo de célula específico tal como, por ejemplo, una célula cardíaca, una célula inmunitaria, una célula de la piel (p. ej. una célula endotelial), una célula del músculo esquelético o una célula cerebral (p.ej. una neurona), pero puede ser cualquier célula, incluidas las células humanas y no humanas.
60

65 En un ejemplo no limitativo, un péptido de transporte de la invención está unido a un resto de carga y transporta el resto de carga a través de la membrana celular de una célula. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una proteína, tal como la caveolina o un factor de transcripción, unida a un péptido de transporte se lleva desde el

entorno extracelular de una célula y se transporta a través de la membrana celular y hasta el entorno intracelular de la célula. En otras realizaciones, un péptido de transporte de la invención unido a un resto de carga une el resto de carga a una célula diana (p.ej., una célula cardíaca). Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte unido a un resto de carga une el resto de carga a una célula diana (p.ej., una célula cardíaca), y transporta el resto de carga desde el entorno extracelular de la célula diana a través de la membrana celular hasta el entorno intracelular de la célula diana.

En determinadas realizaciones, el resto de carga comprende un compuesto orgánico o inorgánico. El compuesto orgánico puede aislarse de la naturaleza (p.ej., a partir de células en las que está presente) o puede producirse utilizando métodos conocidos, tales como métodos de ingeniería genética (por ejemplo, tecnología de ADN o ARN recombinante) o métodos de síntesis química. Por ejemplo, una molécula orgánica puede ser una molécula de ARN, un polipéptido o un fragmento del mismo, que puede aislarse de una célula, expresarse a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante o sintetizarse químicamente. Una molécula orgánica también puede ser una molécula de origen no natural. Un ejemplo no limitativo de una molécula de origen no natural es una secuencia de ácido nucleico que contiene análogos de nucleósidos de origen no natural o enlaces de fosforotioato que unen los nucleótidos y protegen contra la degradación por las nucleasas. Un ribonucleótido que contiene un grupo 2-metilo, en lugar del grupo hidroxilo normal, unido al átomo de carbono 2' de los restos de ribosa, es un ejemplo de una molécula de ARN de origen no natural que es resistente a la degradación enzimática y química. Otros ejemplos de moléculas orgánicas de origen no natural incluyen ARN que contiene 2'-aminopirimidinas (donde dicho ARN es 1.000 veces más estable en suero y orina humanos en comparación con el ARN de origen natural; Lin et al., 1994, Nucl. Acids Res. 22:5229-5234, y Jellinek et al., 1995, Biochemistry, 34:11363-11372).

En determinadas realizaciones, el resto de carga comprende un ADN, un ARN o un análogo de ácido nucleico. El ADN o ARN puede ser un oligo(desoxi) nucleótido de cualquier longitud.

Dichas moléculas de ácidos nucleicos pueden ser lineales, circulares o superhelicoidales; pueden ser ADN o ARN monocatenario o bicatenario; o pueden ser un híbrido de ADN/ARN. Los análogos de ácido nucleico incluyen análogos de la cadena principal con y sin carga, tales como los fosfonatos (p.ej., metilfosfonatos), fosforamidatos (N3' o N5'), tiofosfatos, polímeros a base de morfolino sin carga y ácidos nucleicos peptídicos (ANP). Dichas moléculas pueden usarse en una variedad de regímenes terapéuticos, que incluyen terapia de reemplazo enzimático, terapia génica y terapia antisentido, por ejemplo. Los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) son análogos del ADN. La cadena principal de un ANP está formada por enlaces peptídicos en lugar de ésteres de fosfato, por lo que es muy adecuado para aplicaciones antisentido. Dado que la cadena principal no está cargada, las dobles cadenas de ANP/ADN o ANP/ARN presentan una estabilidad térmica mayor de lo normal. Los ANP tienen la ventaja adicional de que no son reconocidos por nucleasas o proteasas. Los ANP pueden sintetizarse en un sintetizador de péptidos automatizado utilizando la química estándar de t-Boc. El ANP puede estar unido a un péptido de transporte de la invención usando métodos conocidos en la técnica.

En determinadas realizaciones, el resto de carga es un polipéptido. En otras realizaciones, el resto de carga comprende caveolina o un fragmento de la misma. Incluso en otras realizaciones, dos restos de carga, comprendiendo uno un factor de transcripción y comprendiendo el otro un péptido de localización nuclear, están presentes en la construcción de transporte de la invención.

En determinadas realizaciones, el resto de carga comprende una etiqueta, tal como un colorante o un compuesto marcado radiactivamente. En otras realizaciones, el resto de carga comprende rodamina. Incluso en otras realizaciones, el resto de carga comprende un marcador, tal como proteína fluorescente verde, proteína fluorescente azul, proteína fluorescente amarilla, biotina o mezclas de las mismas.

En un ejemplo no limitativo, se pueden usar técnicas recombinantes para unir covalentemente un péptido de transporte a un resto de carga, como unir el ADN o ARN que codifica el péptido de transporte con ADN o ARN que codifica el resto de carga y expresar los productos codificados en una célula hospedadora apropiada (una célula capaz de expresar la construcción de transporte). Como alternativa, las dos secuencias de nucleótidos separadas pueden expresarse en una célula o pueden sintetizarse químicamente y posteriormente combinarse, usando técnicas conocidas. Como alternativa, el péptido de transporte-resto de carga puede sintetizarse químicamente como una secuencia de aminoácidos única y, por tanto, no es necesario combinarlos.

En determinadas realizaciones, cuando hay más de un resto de carga unido al péptido de transporte, el más de un resto puede ser igual o diferente. En otras realizaciones, el resto o restos de carga están unidos al péptido de transporte en el extremo N o C del péptido de transporte. En el caso donde hay al menos dos restos de carga unidos al péptido de transporte, un resto de carga puede estar unido en el extremo N del péptido de transporte y un resto de carga puede estar unido en el extremo C del péptido de transporte. Como alternativa, más de un resto de carga puede estar unido al extremo N o C del péptido de transporte.

En determinadas realizaciones, el resto de carga puede estar unido a un péptido de transporte de la presente invención directamente (*es decir*, a través de un enlace químico) o indirectamente mediante un enlazador. Los enlazadores incluyen, por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos. El enlazador puede ser, por ejemplo, una

secuencia corta de 10 restos de aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 10, de 1 a 5 o de 1 a 4 restos de aminoácidos), y puede incluir opcionalmente un resto de cisteína a través del cual el enlazador se une al péptido de transporte o resto de carga de la construcción de transporte. Un enlazador también puede ser un grupo tal como un grupo sulfhidrilo o un grupo carboxilo. Los enlazadores adecuados incluyen restos alquilo, arilo, aralquilo o peptídicos bifuncionales y multifuncionales, alquil, aril o aralquil aldehídos, ácidos, ésteres y anhídridos, grupos sulfhidrilo o carboxilo, tales como derivados del ácido maleimido benzóico, derivados del ácido maleimido propiónico y derivados de succinimido, o puede derivarse de bromuro o cloruro cianúrico, carbonildiimidazol, ésteres de succinimidilo o haluros sulfónicos. Los grupos funcionales del enlazador utilizados para formar enlaces covalentes entre el enlazador y el resto de carga, por un lado, así como el enlazador y el péptido de transporte, por otro lado, pueden ser dos o más de los grupos, por ejemplo, amino, hidrazina, hidroxilo, tiol, maleimido, carbonilo y carboxilo.

En determinadas realizaciones, la construcción de transporte puede disociarse *in vitro* o *in vivo* en el resto de carga y péptido de transporte mediante escisión química o enzimática. En otras realizaciones, el enlazador comprende restos de aminoácidos y la escisión *in vitro* o *in vivo* se produce dentro del enlazador.

En determinadas realizaciones, donde el resto de carga es un polipéptido, el resto de carga se une al péptido de transporte como una proteína de fusión mediante tecnología recombinante. Una proteína de fusión es el enlace colineal, covalente de dos o más proteínas mediante sus cadenas principales polipeptídicas, a través de la expresión genética de una molécula de ácido nucleico que codifica estas proteínas. El ácido nucleico que codifica el resto de carga de la proteína de fusión está en el marco con el ácido nucleico que codifica el péptido de transporte. "En el marco" indica que la secuencia de ácido nucleico que codifica el resto de carga está en el marco de lectura correcto que la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de transporte. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos correctas se traducen tanto para el péptido de transporte como para el resto de carga de la proteína de fusión.

En determinadas realizaciones, el resto de carga se conjuga con el péptido de transporte mediante reticulación química. Se conocen numerosos métodos químicos de reticulación útiles para unir los péptidos de transporte de esta invención a un resto de carga. El acoplamiento del resto de carga y el péptido de transporte puede realizarse a través de un agente de acoplamiento o enlace. Los reactivos de reticulación intermolecular que se pueden utilizar se ilustran en Means & Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43, y Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991). Entre estos reactivos están, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato ("SPDP") o N,N'-(1,3-fenil)bis(maleimida) (ambos altamente específicos para grupos sulfhidrilo) y forma enlaces irreversibles); N,N'-etileno-bis-(yodoacetamida) u otros reactivos de este tipo que tienen de 6 a 11 puentes de carbono metileno (que son relativamente específicos de grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación útiles para este fin incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrofenilsulfona (que forma enlaces cruzados irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimato de dimetilo (que es específico de grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con grupos amino); hexametilendiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con diferentes cadenas laterales) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

En determinadas realizaciones, los reactivos de reticulación producen una construcción de transporte que es esencialmente no escindible en condiciones celulares. En otras realizaciones, el reactivo de reticulación contiene un enlace covalente, tal como un disulfuro, que se puede escindir en condiciones celulares. Por ejemplo, el ditiobis(succinimidilpropionato) ("DSP"), el reactivo de Traut y el 3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo ("SPDP") son reticulantes escindibles bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación escindible permite que el péptido de transporte se separe del resto de carga después de la administración a la célula diana. Una construcción que comprende un enlace disulfuro directo también puede ser útil dentro de los métodos de la invención. En determinadas realizaciones, el resto de carga está unido covalentemente al péptido de transporte a través de un enlazador o un enlace químico. En otras realizaciones, el reactivo de reticulación tal como éster de N-gamma-maleimidobutiriloxi-succinimida ("GMBS") y sulfo-GMBS tienen inmunogenicidad reducida.

En determinadas realizaciones, la construcción de transporte comprende una proteína de fusión. En otras realizaciones, el vector o la célula hospedadora comprende además elementos de activación transcripcionales que permiten la expresión del ácido nucleico que codifica el péptido de transporte. Los vectores del sistema de expresión, que incorporan los elementos reguladores necesarios para la expresión de proteínas, así como los sitios de endonucleasa de restricción que facilitan la clonación de las secuencias deseadas en el vector, son conocidos por los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, el resto de carga está en el marco con el ácido nucleico que codifica el péptido de transporte.

En un ejemplo no limitativo, un vector de expresión de ADN recombinante que contiene los elementos descritos previamente se introduce en una célula hospedadora apropiada (es decir, una célula capaz de expresar la construcción de transporte) donde los mecanismos celulares de la célula hospedadora dirigen la expresión de la proteína de fusión codificada por el vector de expresión de ADN recombinante. Como alternativa, se pueden usar sistemas sin células conocidos por los expertos en la materia para la expresión de la proteína de fusión.

La proteína de fusión purificada producida por el sistema de la célula hospedadora del vector de expresión se puede

administrar a continuación a la célula diana, donde el péptido de transporte media la importación de la proteína de fusión a través de la membrana celular de la célula diana hasta el interior de la célula. Una célula diana es un tipo de célula específico tal como, por ejemplo, una célula cardíaca, una célula inmunitaria, una célula de la piel, tal como una célula epitelial; una célula del músculo esquelético o una célula cerebral (p.ej., una neurona), pero puede ser cualquier célula, incluidas las células humanas y no humanas.

Se puede seleccionar un sistema de células hospedadoras de vector de expresión entre varios de tales sistemas conocidos por los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión puede expresarse en células hospedadoras aisladas, tales como *Escherichia coli*. En otras realizaciones, las proteínas de fusión pueden expresarse en otros sistemas de expresión bacterianos, sistemas de expresión virales, sistemas de expresión eucariotas o sistemas de expresión sin células. Los hospedadores celulares utilizados por los expertos en la materia incluyen, pero sin limitación, células hospedadoras aisladas tales como, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*, así como células de mamíferos tales como NIH3T3, HeLa, HEK293, HUVEC, células de músculo liso aórtico de rata y células de músculo liso humano adulto. El vector de expresión seleccionado por un experto en la materia incluye elementos de activación transcripcionales tales como elementos promotores y otros elementos reguladores apropiados para la célula hospedadora o sistema sin células en el que se expresará la proteína de fusión. En los sistemas de expresión de mamíferos, por ejemplo, los vectores de expresión adecuados pueden incluir plásmidos de ADN, virus de ADN y virus de ARN. En los sistemas de expresión bacterianos, los vectores adecuados pueden incluir ADN plasmídico y vectores bacteriófagos.

Los ejemplos de sistemas de vectores de expresión específicos incluyen el sistema de vector pBAD/gIII (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para la expresión de proteínas en *E. coli*, que está regulado por el regulador transcripcional AraC. Un ejemplo de un vector para la expresión en mamíferos es el vector de expresión eucariota pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen). En este vector, la construcción de transporte puede expresarse a niveles altos bajo el control de un fuerte promotor de citomegalovirus (CMV). Una etiqueta de polihistidina C-terminal (His₆) permite la purificación de la construcción de transporte usando resina quelante de níquel. La proteína secretada producida por este vector puede detectarse usando un anticuerpo anti-His (extremo C).

También se puede usar un sistema de expresión de baculovirus para la producción de una construcción de transporte que comprende el péptido de transporte y un resto de carga donde el resto de carga es un polipéptido. Un baculovirus de uso común es AcMNPV. La clonación del ADN de la construcción de transporte se puede lograr usando recombinación homóloga. En un ejemplo no limitativo, la secuencia de ADN de la construcción de transporte se clona en un vector de transferencia que contiene un promotor de baculovirus flanqueado por ADN de baculovirus, particularmente ADN del gen de polihedrina. Este ADN se transfecta en células de insecto, donde se produce una recombinación homóloga para insertar el ADN de la construcción de transporte en el genoma del virus original. Los recombinantes se identifican por la alteración de la morfología de la placa.

Muchas construcciones de transporte en las que el resto de carga es un péptido o proteína que no puede modificarse adecuadamente tras la traducción en sistemas de expresión bacterianos, puede expresarse en su lugar con vectores baculovirus. Enzimas, moléculas de señalización, mediadores del control del ciclo celular, factores de transcripción, péptidos antigénicos, productos proteicos de longitud completa de origen viral, bacteriano u otro para uso en terapia de vacunas, productos proteicos de células humanas para usar en terapia de vacunas contra el cáncer, toxinas, y las proteínas implicadas en los sistemas de señalización intracelular que no pueden modificarse adecuadamente tras la traducción en los sistemas de expresión bacteriana pueden expresarse con vectores baculovirus.

Las proteínas descritas anteriormente también pueden producirse mediante el método divulgado en el presente documento por sistemas de expresión viral en mamíferos. También se puede usar un sistema de expresión en mamífero inducible por ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para expresar la construcción de transporte donde la construcción de transporte es una proteína de fusión.

En determinadas realizaciones, las células hospedadoras de levadura, tales como *Pichia pastoris*, se pueden usar para la producción de una construcción de transporte mediante el método de la presente invención. La expresión de proteínas heterólogas de plásmidos transformados en *Pichia* se ha descrito en la patente estadounidense n.º 5.002.876 de Sreekrishna et al. Los vectores para la expresión en *Pichia* de una proteína de fusión que comprende un péptido de transporte de la presente invención y un resto de carga donde el resto de carga es un péptido o proteína están comercialmente disponibles como parte de un kit de expresión en *Pichia* (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

La purificación de la proteína heteróloga producida en *Pichia* se describió en la patente estadounidense n. 5.004.688 de Craig et al., y las técnicas para la purificación de proteínas a partir de sistemas de expresión en levadura son bien conocidas por los expertos en la materia. En el sistema de *Pichia*, los vectores disponibles comercialmente pueden seleccionarse entre aquellos que son más adecuados para la producción de proteínas citosólicas, no glicosiladas y aquellos que son más adecuados para la producción de proteínas secretadas, glicosiladas, o aquellos dirigidos a un orgánulo intracelular, de modo que la expresión de la proteína apropiada puede optimizarse para el resto de carga de elección que es un polipéptido.

Métodos

5 La invención incluye un método para administrar un resto de carga a, o dentro de, también referido como en, una célula diana.

10 La invención incluye además una construcción de transporte para usar en medicina como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, el uso comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una construcción de transporte, como se define en las reivindicaciones, de modo que el resto de carga se administra a(dentro de) la célula diana del sujeto.

15 En determinadas realizaciones, el resto de carga está unido covalentemente al péptido de transporte a través de un enlazador o un enlace químico. En otras realizaciones, el enlazador comprende un enlace disulfuro, o el enlace químico entre el resto de carga y el péptido de transporte comprende un enlace disulfuro. Incluso en otras realizaciones, el resto de carga comprende un resto de péptido. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N del resto de péptido del resto de carga. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo C del resto de péptido del resto de carga. Incluso en otras realizaciones, el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N y al extremo C del resto de péptido del resto de carga.

25 En determinadas realizaciones, el péptido de transporte consiste en la SEQ ID NO: 1. Incluso en otras realizaciones, la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula inmunitaria, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral. Incluso en otras realizaciones, una composición de la invención se administra al sujeto a través de al menos una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, transmucosal, tópica, transdérmica, intradérmica, subcutánea, oftálmica, intravítrea, subconjuntival, supracoroidal, intracameral, inhalatoria, intrabronquial, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intraduodenal, intravesical, parenteral, intratecal, intramuscular e intragástrica. Incluso en otras realizaciones, el sujeto es un ser humano. Incluso en otras realizaciones, el mamífero es un ser humano.

Terapias de combinación

35 Las composiciones útiles dentro de la presente invención están destinadas a ser útiles en los métodos de la presente invención en combinación con uno o más compuestos adicionales útiles para tratar las enfermedades o trastornos contemplados dentro de la invención. Estos compuestos adicionales pueden comprender compuestos de la presente invención o compuestos, por ejemplo, compuestos disponibles comercialmente, conocidos para tratar, prevenir o reducir los síntomas de las enfermedades o trastornos contemplados dentro de la invención.

40 Un efecto sinérgico se puede calcular, por ejemplo, utilizando métodos adecuados tales como, por ejemplo, la ecuación Sigmoidal- E_{max} (Holford & Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453), la ecuación de la aditividad de Loewe (Loewe & Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326) y la ecuación del efecto de la mediana (Chou & Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55). Cada ecuación mencionada anteriormente se puede aplicar a datos experimentales para generar un gráfico correspondiente para ayudar a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Los gráficos correspondientes asociados a las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva de efecto de la concentración, la curva del isoblograma y la curva del índice de combinación, respectivamente.

Administración/Dosificaciones/Formulaciones

50 El régimen de administración puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse al paciente antes o después del inicio de una enfermedad o trastorno. Además, varias dosis divididas, así como las dosis escalonadas pueden administrarse diariamente o secuencialmente, o la dosis puede infundirse continuamente, o puede ser una inyección en bolo. Además, las dosis de las formulaciones terapéuticas pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

60 La administración de las composiciones útiles dentro de la presente invención a un paciente, en determinadas realizaciones, un mamífero, en otras realizaciones, un ser humano, puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos, en dosificaciones y durante períodos de tiempo eficaces para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para lograr un efecto terapéutico puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad o trastorno en el paciente; la edad, el sexo y el peso del paciente; y la capacidad del compuesto terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Pueden ajustarse los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o se puede reducir proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Un ejemplo no limitativo de un intervalo de dosis eficaz para un compuesto

terapéutico de la invención es de aproximadamente 1 a 5.000 mg/kg de peso corporal/por día. Un experto en la materia podría estudiar los factores relevantes y determinar la cantidad eficaz del compuesto terapéutico sin una experimentación excesiva.

5 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración concretos, sin ser tóxicos para el paciente.

10 En particular, el nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto concreto empleado, la hora de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos o materiales usados en combinación con el compuesto, la edad, el sexo, el peso, dolencia, salud general y antecedentes médicos anteriores del paciente que se está tratando, y factores similares, bien conocidos en las técnicas médicas.

15 Un doctor, por ejemplo, médico o veterinario, que sea un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

20 En realizaciones particulares, es especialmente ventajoso formular el compuesto en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las formas farmacéuticas unitarias de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y del efecto terapéutico o profiláctico concreto que se vaya a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos/formular dicho compuesto terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente.

25 En determinadas realizaciones, las composiciones útiles dentro de la invención se formulan usando uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto útil dentro de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y timerosal. En muchos casos, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico, o polialcoholes, tales como manitol y sorbitol, pueden incluirse en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede facilitarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

35 En determinadas realizaciones, las composiciones útiles dentro de la invención se administran al paciente en dosis que varían de una a cinco veces por día o más. En otras realizaciones, las composiciones útiles dentro de la invención se administran al paciente en un intervalo de dosificaciones que incluyen, pero sin limitación, una vez al día, cada dos días, cada tres días a una vez a la semana, y una vez cada dos semanas. Será evidente para un experto en la materia que la frecuencia de administración de las diversas composiciones de combinación útiles dentro de la invención variará de un individuo a otro dependiendo de muchos factores que incluyen, pero sin limitación, la edad, la enfermedad o el trastorno que se vaya a tratar, el género, la salud general, y otros factores.

40 Por tanto, la invención no debe interpretarse como limitada a ningún régimen de dosificación particular y la dosificación precisa y la composición que se administrará a cualquier paciente serán determinadas por el médico responsable teniendo en cuenta todos los demás factores sobre el paciente.

45 Los compuestos para la administración pueden estar en el intervalo de desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 10.000 mg, desde aproximadamente 20 µg hasta aproximadamente 9.500 mg, desde aproximadamente 40 µg hasta aproximadamente 9.000 mg, desde aproximadamente 75 µg hasta aproximadamente 8.500 mg, desde aproximadamente 150 µg hasta aproximadamente 7.500 mg, desde aproximadamente 200 µg hasta aproximadamente 7.000 mg, desde aproximadamente 3.050 µg hasta aproximadamente 6.000 mg, desde aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5.000 mg, desde aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 4.000 mg, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 3.000 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 2.500 mg, desde aproximadamente 20 mg hasta

aproximadamente 2.000 mg, desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 1.500 mg, desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 1.000 mg, desde aproximadamente 75 mg hasta aproximadamente 900 mg, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 800 mg, desde aproximadamente 250 mg hasta aproximadamente 750 mg, desde aproximadamente 300 mg hasta aproximadamente 600 mg, desde aproximadamente 400 mg hasta aproximadamente 500 mg, y cualquiera y todos los incrementos totales o parciales entre ellos.

En determinadas realizaciones, la dosis de un compuesto es desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 2.500 mg. En otras realizaciones, una dosis de un compuesto de la invención utilizada en composiciones descritas en el presente documento es menos de aproximadamente 10.000 mg, o menos de aproximadamente 8.000 mg, o menos de aproximadamente 6.000 mg, o menos de aproximadamente 5.000 mg, o menos de aproximadamente 3.000 mg, o menos de aproximadamente 2.000 mg, o menos de aproximadamente 1.000 mg, o menos de aproximadamente 500 mg, o menos de aproximadamente 200 mg, o menos de aproximadamente 50 mg. De modo similar, en determinadas realizaciones, una dosis de un segundo compuesto (es decir, un fármaco utilizado para tratar una enfermedad o trastorno) como se describe en el presente documento es menos de aproximadamente 1.000 mg, o menos de aproximadamente 800 mg, o menos de aproximadamente 600 mg, o menos de aproximadamente 500 mg, o menos de aproximadamente 400 mg, o menos de aproximadamente 300 mg, o menos de aproximadamente 200 mg, o menos de aproximadamente 100 mg, o menos de aproximadamente 50 mg, o menos de aproximadamente 40 mg, o menos de aproximadamente 30 mg, o menos de aproximadamente 25 mg, o menos de aproximadamente 20 mg, o menos de aproximadamente 15 mg, o menos de aproximadamente 10 mg, o menos de aproximadamente 5 mg, o menos de aproximadamente 2 mg, o menos de aproximadamente 1 mg, o menos de aproximadamente 0,5 mg, y cualquiera y todos los incrementos totales o parciales entre ellos.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica envasada que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, solo o en combinación con un segundo agente farmacéutico; e instrucciones para usar el compuesto para tratar, prevenir o reducir uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un paciente.

Las formulaciones pueden emplearse en mezclas con excipientes convencionales, es decir, sustancias vehículo orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para administración oral, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea, enteral, o cualquier otro modo de administración adecuado, conocido en la técnica. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en los tampones para presión osmótica, coloración, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares. También se pueden combinar donde se desee con otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes que mejoran la cognición.

El término "recipiente" incluye cualquier receptáculo para contener la composición farmacéutica. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el recipiente es el envase que contiene la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el recipiente no es el envase que contiene la composición farmacéutica, es decir, el envase es un receptáculo, como una caja o vial que contiene la composición farmacéutica envasada o la composición farmacéutica no envasada y las instrucciones para el uso de la composición farmacéutica. Además, las técnicas de envasado son bien conocidas en la técnica. Debe entenderse que las instrucciones para el uso de la composición farmacéutica pueden estar contenidas en el envase que contiene la composición farmacéutica y, como tal, las instrucciones forman una relación funcional incrementada con el producto envasado. Sin embargo, debe entenderse que las instrucciones pueden contener información relacionada con la capacidad del compuesto para realizar su función prevista, por ejemplo, tratar, prevenir o reducir una enfermedad o trastorno en un paciente.

Las vías de administración de cualquiera de las composiciones de la invención incluyen la vía oral, bucal, tópica, transdérmica, intradérmica, subcutánea, transmucosal (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, trans- y perivaginal), (intra)nasal y (trans)rectal), oftálmica (por ejemplo, intravítrea, subconjuntival, supracoroidal, intracamerar), inhalatoria, intrabronquial, pulmonar, intraduodenal, intravenosa, intraarterial, intravesical, parenteral, intratecal, intramuscular o intragástrica. Los compuestos para usar en la invención pueden formularse para la administración por cualquier vía adecuada considerada en el presente documento.

Las composiciones adecuadas y las formas farmacéuticas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos ovalados, píldoras, cápsulas de gel, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, jarabes, gránulos, perlas, parches transdérmicos, geles, polvos, aglomerados, magmas, pastillas para chupar, cremas, pastas, apósitos, lociones, discos, supositorios, aerosoles líquidos para administración nasal u oral, polvo seco o formulaciones en aerosol para inhalación, composiciones y formulaciones para administración intravesical y similares. Debe entenderse que las formulaciones y composiciones que serían útiles en la presente invención no están limitadas a las formulaciones y composiciones particulares que se describen en el presente documento.

Administración oral

Para la aplicación oral, particularmente adecuados son comprimidos, grageas, líquidos, gotas, supositorios o

cápsulas, comprimidos ovalados y cápsulas de gelatina. Las composiciones destinadas para uso oral pueden prepararse según cualquier método conocido en la técnica, y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticamente aceptables inertes, no tóxicos, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Dichos excipientes incluyen, por ejemplo un diluyente inerte, tal como lactosa; agentes de granulación y disgregantes, tal como almidón de maíz; agentes aglutinantes, tales como almidón; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas por su idoneidad o para retrasar la liberación de los principios activos. Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina donde el principio activo se mezcla con un diluyente inerte.

Para la administración oral, los compuestos pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, almidón de maíz, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir usando métodos adecuados y materiales de recubrimiento, tales como los sistemas de recubrimiento pelicular OPADRY™ disponibles en Colorcon, West Point, Pa. (por ejemplo, OPADRY™ Tipo OY, Tipo OYC, Orgánico entérico Tipo OY-P, Entérico acuoso Tipo OY-A, Tipo OY-PM y OPADRY™ Blanco, 32K18400). Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de soluciones, jarabes o suspensiones. Las preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes suspensores (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agente emulsionante (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o alcohol etílico); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).

Las técnicas de granulación son bien conocidas en la técnica farmacéutica para modificar polvos u otros materiales en partículas de partida de un principio activo. Los polvos se mezclan normalmente con un material aglutinante en aglomerados o gránulos permanentes fluidos más grandes denominada "granulación". Por ejemplo, los procesos de granulación "húmeda" que usan disolventes generalmente se caracterizan por que los polvos se combinan con un material aglutinante y se humedecen con agua o un disolvente orgánico en condiciones que dan como resultado la formación de una masa granulada húmeda a partir de la cual el disolvente debe evaporarse.

La granulación en estado fundido generalmente consiste en el uso de materiales que son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente (es decir, que tienen un intervalo del punto de ablandamiento o fusión relativamente bajo) para promover la granulación de polvo u otros materiales, esencialmente en ausencia de agua añadida u otros disolventes líquidos. Los sólidos de bajo punto de fusión, cuando se calientan a una temperatura en el intervalo del punto de fusión, se licúan para actuar como aglutinante o medio de granulación. El sólido licuado se extiende sobre la superficie de los materiales en polvo con los que se pone en contacto y, al enfriarse, forma una masa granulada sólida en la que los materiales iniciales se unen entre sí. La granulación en estado fundido resultante se puede transferir a una prensa de comprimidos o se puede encapsular para preparar la forma farmacéutica oral. La granulación en estado fundido mejora la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de un principio activo (es decir, fármaco) formando una dispersión sólida o solución sólida.

La patente estadounidense n.º 5.169.645 divulga gránulos que contienen cera para compresión directa que tienen propiedades de flujo mejoradas. Los gránulos se obtienen cuando las ceras se mezclan en la masa fundida con determinados aditivos que mejoran el flujo, seguido de enfriamiento y granulación de la mezcla. En determinadas realizaciones, solo la propia cera se funde en la combinación fundida de la(s) cera(s) y aditivos(s) y, en otros casos, tanto la(s) cera(s) como el aditivo(s) se fundirán.

La presente invención también incluye un comprimido multicapa que comprende una capa que proporciona la liberación retardada de uno o más compuestos de la invención, y una capa adicional que proporciona la liberación inmediata de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Usando una mezcla de cera/polímero sensible al pH, se puede obtener una composición insoluble gástrica en la que el principio activo queda atrapado, asegurando su liberación retardada.

Administración parenteral

Para su administración parenteral, los compuestos se pueden formular para inyección o infusión, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o inyección o infusión subcutánea, o para administración en una dosis de bolo y/o infusión continua. Se pueden usar soluciones, suspensiones o emulsiones en un vehículo oleoso o acuoso, que contienen opcionalmente otros agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Formas de administración adicionales

Las formas farmacéuticas adicionales de esta invención incluyen formas farmacéuticas como se describe en las patentes de EE.UU. números 6.340.475, 6.488.962, 6.451.808, 5.972.389, 5.582.837, y 5.007.790. Las formas

farmacéuticas adicionales de esta invención incluyen también formas farmacéuticas como se describe en las solicitudes de patente de Estados Unidos números 2003/0147952, 2003/0104062, 2003/0104053, 2003/0044466, 2003/0039688, y 2002/0051820. Las formas farmacéuticas adicionales de esta invención incluyen también formas farmacéuticas como se describe en las solicitudes PCT números WO 03/35041, WO 03/35040, WO 03/35029, WO 5 03/35177, WO 03/35039, WO 02/96404, WO 02/32416, WO 01/97783, WO 01/56544, WO 01/32217, WO 98/55107, WO 98/11879, WO 97/47285, WO 93/18755, y WO 90/11757.

Formulaciones de liberación controlada y sistemas de administración de fármacos

10 En determinadas realizaciones, las formulaciones de la presente invención pueden ser, pero sin limitación, formulaciones de liberación a corto plazo, de compensación rápida, así como de liberación controlada, por ejemplo, de liberación sostenida, de liberación retardada y de liberación pulsátil.

15 La expresión liberación sostenida se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un período prolongado de tiempo y que, aunque no necesariamente, puede dar como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período prolongado de tiempo. El período de tiempo puede ser de hasta un mes o más y debe ser una liberación que sea más larga que la misma cantidad de agente administrado en forma de bolo.

20 Para la liberación sostenida, los compuestos pueden formularse con un polímero adecuado o material hidrófobo que proporcione propiedades de liberación sostenida a los compuestos. Como tal, los compuestos para usar en el método de la invención se pueden administrar en forma de micropartículas, por ejemplo, por inyección o en forma de obleas o discos por implantación.

25 En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención se administran a un paciente, solos o en combinación con otro agente farmacéutico, usando una formulación de liberación sostenida.

30 La expresión liberación retardada se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona una liberación inicial del fármaco después de cierto retraso tras la administración del fármaco y que, aunque no necesariamente, incluye un retraso de aproximadamente 10 min a aproximadamente 12 horas.

35 La expresión liberación pulsátil se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco de tal manera que produce perfiles plasmáticos pulsátiles del fármaco después de la administración del fármaco.

La expresión liberación inmediata se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco inmediatamente después de la administración del fármaco.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, a corto plazo se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 min, aproximadamente 20 min o aproximadamente 10 min y cualquiera o todos los incrementos completos o parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, de compensación rápida se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 min, aproximadamente 20 min o aproximadamente 10 min y cualquiera y todos los incrementos completos o parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

Dosificación

55 La cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto dependerá de la edad, el sexo y el peso del paciente, el estado médico actual del paciente y la progresión de la enfermedad de Parkinson en el paciente que está siendo tratado. El experto en la materia podrá determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

60 Una dosis adecuada de un compuesto de la presente invención puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 5.000 mg al día, tal como desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 1.000 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 mg, tal como desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 250 mg al día. La dosis se puede administrar en una dosificación única o en múltiples dosificaciones, por ejemplo, desde 1 hasta 4 o más veces al día. Cuando se utilizan múltiples dosificaciones, la cantidad de cada dosificación puede ser igual o diferente. Por ejemplo, una dosis de 1 mg al día se puede administrar como dos dosis de 0,5 mg, con aproximadamente un intervalo de 12 horas entre dosis.

65 Se entiende que la cantidad del compuesto administrado al día se puede administrar, en ejemplos no limitativos,

cada día, en días alternos, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días o cada 5 días. Por ejemplo, con la administración en días alternos, se puede iniciar una dosis de 5 mg al día el lunes con una primera dosis posterior de 5 mg al día administrada el miércoles, una segunda dosis posterior de 5 mg al día se puede administrar el viernes, etc.

- 5 Los compuestos para usar en el método de la invención pueden estar formulados en formas farmacéuticas unitarias. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los individuos sometidos a tratamiento, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, opcionalmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente adecuado. La forma farmacéutica unitaria puede ser una única dosis
- 10 diaria o una de múltiples dosis diarias (por ejemplo, aproximadamente 1 a 4 o más veces al día). Cuando se utilizan múltiples dosis diarias, la forma farmacéutica unitaria puede ser la misma o diferente para cada dosis.

- Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de discernir no utilizando más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos, realizaciones, reivindicaciones, y ejemplos descritos en el presente documento. Tales equivalentes se consideraron dentro del alcance de esta invención y cubiertos por las reivindicaciones adjuntas a la misma. Por ejemplo, debe entenderse que, las modificaciones en las condiciones de reacción, incluyendo, pero sin limitación, los tiempos de reacción, tamaño/volumen de la reacción, y reactivos experimentales, tales como disolventes, catalizadores, presiones, condiciones atmosféricas, por ejemplo, atmósfera de nitrógeno y agentes reductores/oxidantes, con alternativas reconocidas en la técnica y que no utilizan
- 15 más que la experimentación de rutina, están dentro del alcance de la presente solicitud.

- Debe entenderse que, siempre que se proporcionen valores e intervalos en el presente documento, todos los valores e intervalos abarcados por estos valores e intervalos, se prevé que estén todos incluidos dentro del alcance de la presente invención. Además, todos los valores incluidos dentro de estos intervalos, así como los límites superior o inferior de un intervalo de valores, también están contemplados por la presente solicitud.
- 25

Los siguientes ejemplos ilustran más aspectos de la presente invención. Sin embargo, de ninguna manera son una limitación de las enseñanzas o la divulgación de la presente invención como se establece en el presente documento.

30 Ejemplos

La invención se describe ahora en referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y la invención no se limita a estos Ejemplos.

35 Materiales y Métodos

Aislamiento de células y cultivo:

- Las células endoteliales microvasculares de corazón de rata cultivadas (RHMVEC) se adquirieron de VEC Technologies (Rensselaer, NY) y se cultivaron en placas recubiertas con fibronectina en medio completo MCDB-131 (VEC Technologies). Las BAEC se aislaron de aortas bovinas obtenidas de un matadero local y se cultivaron en DMEM (glucosa alta; Cellgro) suplementado con FBS 10 % (Hyclone) y pen/estrep. Las HUVECS se aislaron localmente de los cordones umbilicales humanos y se cultivaron en medio M199 (Invitrogen) suplementado con suplemento de crecimiento de células endoteliales (Invitrogen), FBS 10 %, L-glutamina (Invitrogen) y pen/estrep.
- 45

Construcción de la biblioteca de fagos de T7:

- El sistema de presentación de fagos Novagen T7select se usó para el cribado aleatorio de péptidos que facilitan la captación de células endoteliales junto con un grupo de oligonucleótidos que codifican aleatoriamente péptidos de 7 aminoácidos. Los cebadores de péptidos aleatorios de 7 aminoácidos que contienen sitios HindIII/XhoI se diseñaron de la siguiente manera: Cebador sentido: 5'-GCTAGAATTCNNBNBNBNBNBNBNBNBAAGCTTACTGCAGTAGCATG-3' (SEQ ID NO: 9); Cebador anti-sentido 5'-CATGCTACTGCAGTAAGCTT-3' (SEQ ID NO: 10); donde N=A, T, C, G; y B=G, C, T.
- 50

- Se mezcló e hibridó una cantidad similar de cada cebador a 95 °C durante 5 min, a continuación se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se llevaron a cabo las reacciones de relleno usando la enzima Klenow para generar fragmentos de ADN con extremos romos. Tras la digestión con HindIII/XhoI, se ligaron 0,06 pmol de insertos en el vector T7select415-lb. La reacción de ligación se añadió directamente a los extractos de empaquetamiento de T7 para el empaquetamiento *in vitro* y se generó 3×10^7 ufp de una librería de fagos. Para la amplificación, la biblioteca se inoculó con cultivo BL21 (OD₆₀₀ de 0,5-1,0) y se indujo con IPTG 1 mM a 37 °C durante 2 horas hasta que se observó la lisis celular. Los fagos que contienen el lisado se aclararon por centrifugación a 8000 x g durante 10 min, el sobrenadante se tituló y las alícuotas se almacenaron a 4 °C.
- 60

Selección de fagos por endocitosis en CE y amplificación:

- RHMVEC (80 % confluencia; aproximadamente 2×10^7 células/placa de 100 mm) se lavaron con PBS y se
- 65

preincubaron en medio sin suero a 37 °C durante 30 min y se inoculó con un extracto (5×10^9 ufp) de la biblioteca de fago T7 hasta alcanzar una multiplicidad de infección (MOI) de 250. Después de incubación durante 1 hora a 37 °C, las células se lavaron con PBS enfriada con hielo y se lavaron con ácido HCl 0,1N, pH 2,2, durante 15 segundos para eliminar los fagos no unidos y asociados débilmente de la superficie celular. A continuación las células se tripsinizaron, se centrifugaron y se lisaron con agua desionizada estéril en hielo. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y el sobrenadante que contenía fagos previamente internalizados se amplificó como se describió anteriormente y se tituló entre cada ronda para asegurar que se usaban 5×10^9 ufp de fagos de entrada al comienzo de cada ronda sucesiva. Después de completar seis rondas de selección/amplificación, *Escherichia Coli* BL21 se infectó con los fagos resultantes y se sembró en placas, se recogieron, se amplificaron y secuenciaron placas individuales.

Síntesis de péptidos:

Los péptidos, correspondientes a Endo5 (RRPPR) (SEQ ID NO: 1) o *Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO: 2) con o sin carga fusionados con su extremo C (aminoácidos de la caveolina-1 82-101; DGIWKASFTTFTVTKYWFYR) (SEQ ID NO: 5) se sintetizaron mediante química Fmoc estándar y se analizaron mediante espectrometría de masas para confirmar la pureza en el centro de recursos de biotecnología W.M. Keck de la Facultad de Medicina de la Universidad de Yale. Tras la síntesis se añadieron fluoróforos (carboxifluoresceína para Endo5 y rodamina para AP) al extremo N.

Antes de cada experimento, se pesaron los péptidos desecados, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO; J.T. Baker, Philipsburg, NJ) a 5×10^{-2} - 10^{-2} M y se diluyeron hasta 10^{-3} M con agua destilada.

Liberación de NO:

Los experimentos de liberación de NO inducida por VEGF se realizaron como se describió anteriormente. En resumen, las BAEC confluentes se incubaron en DMEM sin suero durante 6 horas con péptidos. Los medios se eliminaron y se añadió DMEM sin suero fresco, con o sin VEGF (10^{-9} M) durante 30 min. Se recogieron los medios, se tripsinizaron las células y se contaron, y se determinaron los niveles de nitritos en el sobrenadante usando un analizador de quimioluminiscencia de NO de Sievers.

Ensayo de Miles modificado:

La extravasación de plasma en la piel del ratón se estudió utilizando el ensayo de Miles como se describió anteriormente. En resumen, se anestesiaron ratones suizos machos (30-35 g) y se les inyectó azul de Evans (30 mg/kg en PBS; Sigma). Se aplicó fenilisotiocianato (5 % en aceite mineral), un análogo del aceite de mostaza (Pierce, Rockford, Illinois) en la oreja derecha con la punta de un algodón. La oreja izquierda se usó como control y se trató con aceite mineral solo. Después de 30 min, los animales anestesiados se sacrificaron, se perfundieron, se extrajeron las orejas, se secaron y se pesaron. El azul de Evans se extrajo de las orejas con formamida y se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm.

Cuantificación de la internalización:

Las BAEC cultivadas se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta que se alcanzó la confluencia. Las células se lavaron y se incubaron en 1 ml de DMEM que contenía péptidos marcados (10^{-6} M) durante 1, 2, 4 o 6 horas a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS frío que contenía glicina 0,1 M (pH 4) para eliminar la tinción superficial no específica. Después de la eliminación completa de los medios, las células se tripsinizaron, se centrifugaron y las proteínas se extrajeron agregando 150 μ l de tampón de lisis a base de SDS o Triton X-100. Las membranas se eliminaron por centrifugación, y los péptidos internalizados se cuantificaron usando un lector de placa de fluorescencia (Perseptive Biosystems). Las células incubadas con péptidos durante 5 min y lavadas como se ha descrito se usaron como tinción superficial basal. La linealidad de ambos fluoróforos utilizados se determinó realizando una curva de concentración-fluorescencia usando una solución de lisis. Los experimentos con cada fluoróforo se realizaron individualmente para evitar interferencias cruzadas.

Imagen de los CPP en HUVEC vivas:

Las HUVEC recién aisladas se cultivaron en medio M199 suplementado con glutamina, FBS 10 % y suplemento de crecimiento de células endoteliales en placas de Petri con fondo de vidrio. Dado que los CPP se unen de forma no específica al vidrio, la fluorescencia de fondo se redujo mediante el pretratamiento de las placas de Petri con fondo de vidrio con una solución de bloqueo que contiene AP y Endo5 sin marcar durante 30 min (5×10^{-5} M) en medios M199 incoloros con FBS 1 %. Después de la siembra de las células, se eliminaron los medios y se añadieron Endo5 marcada con carboxifluoresceína y AP marcado con rodamina a las células (10^{-5} M) y las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 1 hora (pulso). Se retiraron los medios, se enjuagaron las células una vez con medios de cultivo calientes y se visualizó rápidamente la captación de péptidos en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert realizando una pila de imágenes capturadas Z seguido de desconvolución de volumen (software Openlab). Los nuevos medios se dejaron en las células durante 2 horas adicionales (3 horas en total) para seguir la

localización de los CPP, y las células se visualizaron nuevamente (seguimiento).

Análisis estadístico:

- 5 Los datos son la media \pm E.E. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante análisis de la varianza seguido de una prueba t de Student no apareada. Los datos se consideraron significativamente diferentes si se observaban valores de $p < 0,05$.

Ejemplo 1: Detección de la biblioteca de fagos para péptidos que median la internalización de fagos

10 Se generó una biblioteca de expresión en fagos T7 que expresa como promedio de 0,1-1 copia de péptidos de 7 aminoácidos en la cápside generados al azar. Este sistema se usó porque el bajo número de péptidos en la cápside lo hace adecuado para la selección de péptidos que se unen fuertemente a sus dianas. Se añadió una cantidad constante de fagos de entrada (5×10^9) a las RHMVEC cultivadas y estos fagos se seleccionaron por su capacidad de ser rápidamente internalizados (captación celular) por la monocapa celular. Después de seis rondas de infección/purificación, se observó un aumento de 100 veces en el porcentaje de fagos recuperados, desde 0,018 (ronda 1) hasta 1.8 % (ronda 6) en condiciones iniciales idénticas (Tabla 1), proporcionando evidencia de que la biblioteca de fagos resultante muestra propiedades mejoradas de internalización de células endoteliales. El análisis de la capacidad de internalización de la biblioteca de fagos en las células endoteliales después de cada ronda de selección sugiere un aumento exponencial en el porcentaje de captación (Fig. 1, $R^2 = 0,975$ para la correlación con función exponencial).

25 Tras completarse la purificación por afinidad y enriquecimiento, los fagos resultantes se sembraron en placas, y se amplificaron y secuenciaron placas individuales. De los 24 fagos aislados individuales, cinco fagos codificaron inesperadamente el péptido corto de 5 aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO: 1), denominado Endo5, que fue el péptido identificado con mayor frecuencia (21 %). El análisis de codones de la secuencia de ADN del fago que codifica Endo5 reveló la inserción aleatoria e inesperada de un codón de parada en la secuencia de codificación (CGGCGCCCGCTCGTTGAGGG) (SEQ ID NO: 8). que justificaba el tamaño más pequeño de Endo5 en comparación con el tamaño teórico de CPP que nuestro enfoque puede generar (7 aminoácidos).

30 Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, la alta recuperación de Endo5 después de la purificación por afinidad de fagos puede atribuirse a su tamaño relativamente pequeño en comparación con los péptidos teóricos de 7 aminoácidos para los cuales está diseñado el enfoque de purificación por afinidad. Sin embargo, otros CPP que varían de 4 a 7 aminoácidos se aislaron con la técnica descrita en el presente documento, y ninguno de ellos muestra la alta tasa de recuperación de Endo5, lo que va en contra de una selección dependiente del tamaño.

Ejemplo 2: Actividad inhibitoria de eNOS

40 AP-Cav bloquea la actividad de eNOS inducida por el agonista en células endoteliales cultivadas (Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7), y esta actividad biológica depende de la internalización de AP-CAV, la dosificación y tiempo de pretratamiento. En el presente estudio, el potencial de captación de Endo5 se comparó con el de AP analizando el efecto de Endo5 fusionada a Cav (endo5-Cav) sobre la liberación de NO por las BAEC cultivadas.

45 Un pretratamiento de seis horas de BAEC con AP o Endo5 sin carga, o con AP-Cav o Endo5-Cav (10^{-5} M) no tuvo ningún efecto significativo sobre la liberación basal (no estimulada) de NO (Fig. 2A) según el ensayo de quimioluminiscencia específica de NO. El pretratamiento similar con AP o Endo5 no mostró ningún efecto significativo sobre la liberación de NO inducida por VEGF, mientras que el pretratamiento con AP-Cav (10^{-5} M) bloqueó la actividad de VEGF en un 48 % (Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7). Curiosamente, un pretratamiento similar con Endo5-Cav (10^{-5} M) alteró completamente la actividad de VEGF en la liberación de NO de las BAEC (Fig. 50 2A), proporcionando evidencia de que la captación mediada por Endo5 era más eficiente que la de AP.

El efecto farmacológico de Endo5-Cav sobre la liberación de NO inducida por VEGF se estudió adicionalmente realizando experimentos de inhibición dependientes de la dosis. El pretratamiento con Endo5-Cav (10^{-6} a 10^{-5} M) provocó una inhibición dependiente de la dosis de la liberación de NO inducida por VEGF (Fig. 2B) con un efecto casi máximo a 10^{-5} M. La actividad de AP-Cav alcanzó la inhibición máxima de la actividad a $2,5 \times 10^{-5}$ M debido a la insolubilidad del péptido a una dosis mayor, pero mostró una actividad inhibitoria mucho más débil (61 % de inhibición). El análisis de las curvas de respuesta a la dosis seguido de regresión no lineal (ajuste de la curva) reveló que la EC_{50} de AP-Cav y Endo5-Cav eran $1,8 \times 10^{-6}$ y $7,5 \times 10^{-6}$ M, respectivamente.

60 Dado que la inhibición de Endo5-Cav sobre la actividad de eNOS inducida por VEGF fue más sólida que la de AP-Cav a una concentración similar, se realizó una comparación dependiente del tiempo entre el efecto de AP-Cav y Endo5-Cav sobre la actividad de eNOS. AP-Cav (10^{-5} M) tuvo un efecto dependiente del tiempo sobre la liberación de NO inducida por VEGF en BAEC (Fig. 2C) aunque se observa una diferencia menor entre los puntos de tiempo de incubación de 4 h y 6 h (57 % frente a 49 %, respectivamente), lo que sugiere que se puede alcanzar un equilibrio casi completo entre la absorción de AP-Cav y la degradación/eliminación intracelular.

65

El efecto inhibitorio de Endo5-Cav también era dependiente del tiempo pero más fuerte, con una inhibición completa de la eNOS a las 4 horas, lo que sugiere una internalización más rápida de Endo5. Además, los datos indicaron que un pretratamiento de seis horas con AP-Cav (10^{-5} M) tuvo un efecto similar en la liberación de NO inducida por VEGF en comparación con un pretratamiento de dos horas con Endo5-Cav a una concentración similar, lo que proporcionó evidencia de que la tasa de captación de Endo5-Cav fue aproximadamente tres veces mayor que la de AP-Cav (Fig. 2C).

El dominio Cav AB (aminoácidos 82-95; SEQ ID NO: 6) media en la inhibición de eNOS (Bernatchez et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. 102:761-66). Dado que Endo5 parece más potente que AP para promover la internalización de la carga, se modificaron las secuencias líder y de carga de AP-Cav para maximizar la relación efecto/tamaño terapéutico en comparación con AP-Cav. Por lo tanto, se sintetizó Endo5-CavAB (un péptido de 19 aminoácidos) y su actividad se comparó con la de AP-Cav (un péptido de 36 aminoácidos). El pretratamiento de BAEC durante seis horas con Endo5-CavAB (10^{-5} M) bloqueó completamente la liberación de NO inducida por VEGF, mientras que AP-Cav inhibió el efecto de VEGF en solo un 52 % (Fig. 2D) a una dosis similar. Curiosamente, el pretratamiento con Endo5-CavAB (2×10^{-6} M) tuvo un efecto similar al de AP-Cav (10^{-5} M), inhibiendo la liberación de NO inducida por VEGF en un 49 %.

En conjunto, estos datos sugieren la viabilidad de optimizar tanto la secuencia de captación por las células de AP-Cav como la carga para maximizar el potencial terapéutico por molécula o por aminoácido.

Ejemplo 3: Propiedades antiinflamatorias

La producción de NO derivada de CE desempeña un papel activo en la inflamación, en parte al promover el aumento de la presión intracapilar y la posterior permeabilidad vascular. El pretratamiento de ratones con AP-Cav bloquea la extravasación vascular en el ensayo de Miles (Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7; Bernatchez et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102:761-6). Este modelo establecido puede ser una herramienta valiosa para evaluar la potencia *in vivo* de péptidos fusionados con Endo5.

Un pretratamiento de una hora de ratones con AP-Cav (1 mg/kg) (Fig. 3A) atenuó en un 37 % ($n = 6$ por grupo) en comparación con los ratones tratados con AP solo (dosis similar basado en el peso molecular). Endo5-Cav inhibió la trasvasación vascular inducida por el aceite de mostaza en un 58 % en comparación con el pretratamiento con Endo5 solo ($n = 6$ u 8 por grupo) y mostró una actividad inhibitoria mayor estadísticamente significativa que AP-Cav ($\dagger P < 0,05$). Tal como se ilustra en la Fig. 3B, tanto AP-Cav como Endo5-Cav atenúan la extravasación de azul de Evans en la piel y el tejido de la oreja en comparación con los péptidos de control, aunque Endo5-Cav era más potente. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, la inhibición incompleta mostrada por Endo5-Cav en la inflamación inducida por el aceite de mostaza puede explicarse por la observación de que el NO juega solo un papel parcial en la mediación de la permeabilidad vascular en este modelo (Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7).

Ejemplo 4: Internalización por células endoteliales

El AP es un CPP que atraviesa la membrana de las neuronas (Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88:1864-8). Como se describe en otra parte en el presente documento, se descubrió inesperadamente que Endo5 promueve una alta internalización de los fagos en las células endoteliales, y se descubrió inesperadamente que Endo5-Cav era más potente que AP-Cav para prevenir la activación de eNOS y la permeabilidad vascular.

En el presente estudio, la tasa de internalización de Endo5 se comparó directamente con la de AP mediante el uso de carboxifluoresceína y la forma marcada con rodamina de cada péptido, respectivamente. La linealidad de cada péptido acoplado al fluoróforo se confirmó realizando una curva de concentración/fluorescencia estándar. Tal como se ilustra en la Fig. 4A, se realizó la calibración para obtener valores de absorbancia similares para ambos fluoróforos (ajustando la configuración de ganancia para cada fluoróforo). Las BAEC se incubaron por separado con péptidos marcados con fluoróforo (10^{-6} M) durante 1, 2, 4 o 6 horas, se lavaron con ácido, se lisaron y la captación total de péptido se determinó cuantificando la fluorescencia.

Se observó un aumento lineal en la internalización de AP con el tiempo (Fig. 4B), alcanzando un máximo a las 6 horas a un valor de $1,07 \times 10^{-9}$ moles de AP/ 10^6 células. Esto indica que aproximadamente el 11 % de la cantidad total de rodamina-AP añadida en el momento cero es internalizada por una monocapa confluyente de BAEC en los entornos, lo que proporciona evidencia de un mecanismo de concentración activa. La tasa de internalización de carboxifluoresceína-Endo5 fue tres veces mayor que la de AP, alcanzando también el máximo a las 6 horas con un valor de $2,85 \times 10^{-9}$ moles de Endo5/ 10^6 células, lo que sugiere que el 30,5 % del péptido añadido se internalizó después de 6 horas (Fig. 4B).

Ejemplo 5: Internalización en células endoteliales vivas

En estudios previos que intentaron arrojar luz sobre los mecanismos de captación involucrados en la entrada de CPP en las células, la imagen se tomó en células fijadas. Los resultados de estos estudios pueden no ser fiables en vista de la creciente evidencia de que la fijación de las células conduce a la inesperada translocación nuclear de

CPP (Richard et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:585-90).

En el presente estudio, se realizaron experimentos de microscopía de epifluorescencia en HUVEC vivas para comparar el mecanismo de captación de Endo5 con AP. Después de bloquear las placas de Petri con fondo de vidrio con AP no marcado y Endo5 para minimizar la unión no específica de los péptidos marcados, las HUVEC recién aisladas se cultivaron hasta un 50 % de confluencia y se marcó con un "pulso" de carboxifluoresceína-Endo5 y rodamina-AP (10^{-6} M) durante 1 h, se aclararon, seguido de un "seguimiento" de dos horas durante un total de 3 horas. Las imágenes desconvolucionadas se capturaron después de los periodos de "pulso" y "seguimiento". Tanto Endo5 (canal verde) como AP (canal rojo) muestran tinción citoplasmática punteada difusa en HUVEC vivas después de 1 h de incubación a 37 °C (Fig. 5A). La tinción nuclear estaba casi completamente ausente (área central oscura). Curiosamente, las imágenes fusionadas revelaron un alto grado de colocalización entre Endo5 y AP, caracterizado por el color amarillo (Fig. 5A, izquierda). Esta observación sugiere similitud entre las vías de internalización temprana Endo5 y AP. La incubación individual de HUVEC con rodamina-AP causó poca o ninguna señal en el canal de carboxifluoresceína-Endo5 y viceversa, lo que sugiere la ausencia de sangrado significativo.

Después de un período de "seguimiento" de dos horas en ausencia de CPP, la tinción punteada tanto para Endo5 como para AP todavía era apreciable, pero mostraba un patrón más concentrado en lugar de difuso, lo que apoya un mecanismo activo de concentración/localización intracelular (Fig. 5B, izquierda). Las imágenes fusionadas revelaron nuevamente la colocalización entre Endo5 y AP durante esta fase a largo plazo de la concentración de péptidos intracelulares (seguimiento) después de la internalización inicial desde la superficie celular. Se muestran células representativas. En conjunto, estos datos ilustran la similitud de la internalización y distribución intracelular entre Endo5 y AP.

La similitud de las vías de internalización entre Endo5 y AP se confirmó realizando estudios de competición y cuantificando la capacidad de Endo5 y AP para promover la entrada de carga en las células. Tal como se ilustra en la Fig. 5C, el efecto parcial de AP-Cav (10^{-5} M) sobre la liberación de NO inducida por VEGF fue bloqueado por el pretratamiento con AP o Endo5 (5×10^{-5} M). La inhibición casi completa de la liberación de NO inducida por VEGF mediada por Endo5-Cav se evitó parcialmente mediante el pretratamiento con AP o Endo5 (5×10^{-5} M). Tal como se ilustra en la Fig. 5C, la inhibición del 91 % de la liberación de NO inducida por VEGF por Endo5-Cav se evitó mediante AP (inhibición del 30 %) o Endo5 (inhibición del 13 %). En conjunto, estos resultados sugieren que AP y Endo5 se internalizan a través de vías similares en las CE.

Tabla 1: Enriquecimiento de la capacidad de internalización de fagos tras 6 rondas de purificación por afinidad

Se incubaron RHMVEC durante 1 hora con $5,0 \times 10^9$ fagos (entrada), se lisaron y los fagos recuperados se cuantificaron (captación celular) y se amplificaron para la siguiente ronda de purificación por afinidad. El porcentaje de recuperación se expresa como la relación entre fagos recuperados y fagos de entrada.			
Ronda de infección	Fagos de entrada (sobrenadante)	Fagos recuperados (captación celular)	Recuperación %
1	$5,0 \times 10^9$	$9,4 \times 10^5$	0,018
2	$5,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^6$	0,076
3	$5,0 \times 10^9$	$7,5 \times 10^6$	0,15
4	$5,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^7$	0,56
5	$5,0 \times 10^9$	$4,5 \times 10^7$	0,90
6	$5,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^7$	1,8
			24 fagos individuales aislados

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yale University Sessa, William C. Giordano, Frank J

<120> Nuevas composiciones penetrantes de células y métodos de uso de las mismas

<130> 047162-7002WO1 (00287)

<150> US 61/908.963

<151> 2013-11-26

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 1

15 Arg Arg Pro Pro Arg
1 5

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

25 <400> 2

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

30 <210> 3
<211> 178
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 3

ES 2 806 027 T3

Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val
1 5 10 15

Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met
20 25 30

Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu
35 40 45

Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val
50 55 60

Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser
65 70 75 80

Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
85 90 95

Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala
100 105 110

Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp
115 120 125

Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile
130 135 140

Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe
145 150 155 160

Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys
165 170 175

Glu Ile

<210> 4
<211> 151
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 806 027 T3

Met Met Ala Glu Glu His Thr Asp Leu Glu Ala Gln Ile Val Lys Asp
 1 5 10 15

Ile His Cys Lys Glu Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys Asn Ile
 20 25 30

Asn Glu Asp Ile Val Lys Val Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro
 35 40 45

Val Gly Thr Tyr Ser Phe Asp Gly Val Trp Lys Val Ser Tyr Thr Thr
 50 55 60

Phe Thr Val Ser Lys Tyr Trp Cys Tyr Arg Leu Leu Ser Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Gly Val Pro Leu Ala Leu Leu Trp Gly Phe Leu Phe Ala Cys Ile Ser
 85 90 95

Phe Cys His Ile Trp Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Tyr Leu Ile
 100 105 110

Glu Ile Gln Cys Ile Ser His Ile Tyr Ser Leu Cys Ile Arg Thr Phe
 115 120 125

Cys Asn Pro Leu Phe Ala Ala Leu Gly Gln Val Cys Ser Ser Ile Lys
 130 135 140

Val Val Leu Arg Lys Glu Val
 145 150

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr
 1 5 10 15

Trp Phe Tyr Arg
 20

10

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 6

ES 2 806 027 T3

Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr
 1 5 10

5 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 7
 cggcgccccgc ctcgt 15

15 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 8
 cggcgccccgc ctcgttgagg g 21

25 <210> 9
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> A, T, C, o G

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> A, T, C, o G

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> A, T, C, o G

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> G, C, o T

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> A, T, C, o G

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> A, T, C, o G

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> G, C, o T

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> A, T, C, o G

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> A, T, C, o G

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> G, C, o T

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> A, T, C, o G

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> A, T, C, o G

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> G, C, o T

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> A, T, C, o G

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> A, T, C, o G

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> G, C, o T

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> A, T, C, o G

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> A, T, C, o G

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> G, C, o T

ES 2 806 027 T3

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> A, T, C, o G

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> A, T, C, o G

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> G, C, o T

<400> 9
gctagaattc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnaagcttac tgcagtagca tg 52

20 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 10
catgctactg cagtaagctt 20

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de transporte aislada, o una sal o solvato de la misma, que consiste en un péptido de transporte de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que está unido a un resto de carga que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-6.
- 10 2. Una composición que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un péptido de transporte que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y un ácido nucleico adicional que codifica al menos un resto de carga que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-6.
- 15 3. Un método *in vitro* de administración de un resto de carga a o dentro de una célula diana, comprendiendo el método poner en contacto la célula diana con una construcción de transporte, donde la construcción de transporte consiste en un péptido de transporte de SEQ ID NO: 1 que está unido a un resto de carga que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-6, de modo que el resto de carga se administra a o dentro de la célula diana.
- 20 4. El método *in vitro* de la reivindicación 3, donde el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N o al extremo C del resto de péptido del resto de carga.
- 25 5. Una construcción de transporte para su uso en medicina, donde la construcción de transporte consiste en un péptido de transporte que consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que está unida a un resto de carga que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-6, de modo que el resto de carga se administra a o dentro de una célula diana.
6. La construcción de transporte para usar de acuerdo con la reivindicación 5, donde el péptido de transporte está unido covalentemente a través de un enlace amida al extremo N o al extremo C del resto de péptido del resto de carga.

Fig. 1

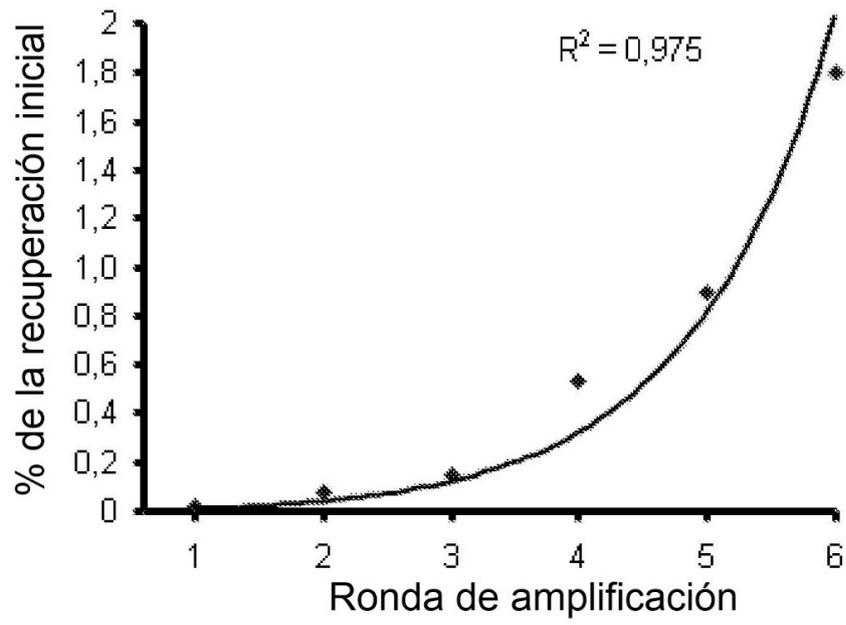


Fig. 2A

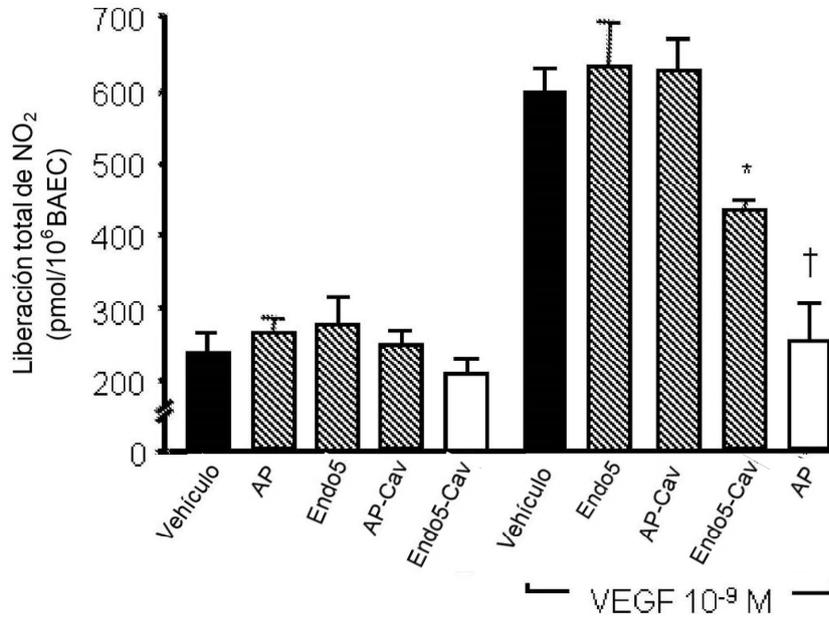


Fig. 2B

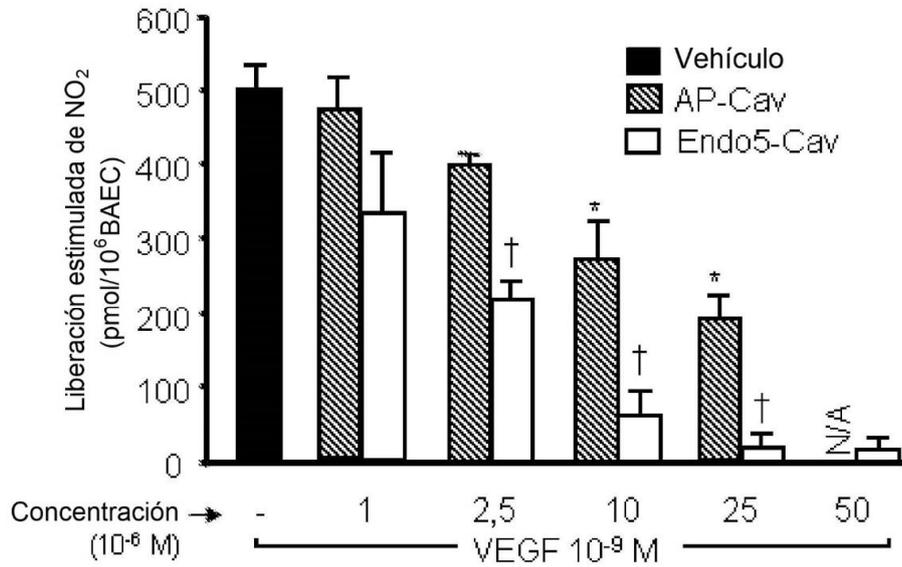


Fig. 2C

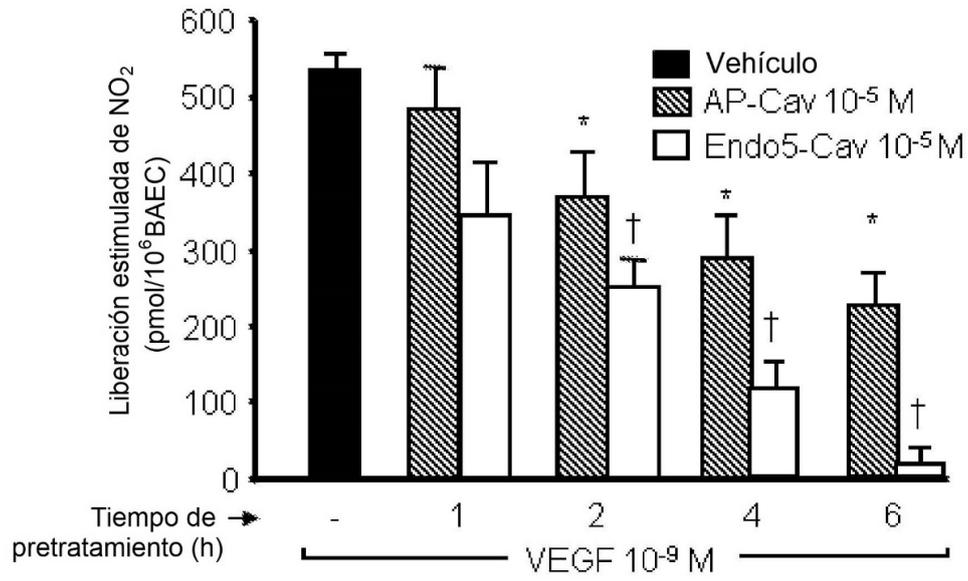


Fig. 2D

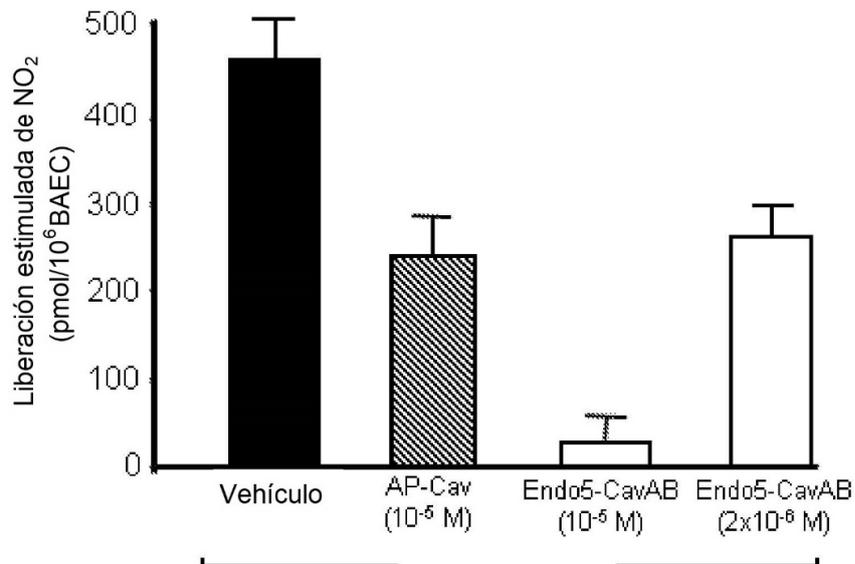


Fig. 3A

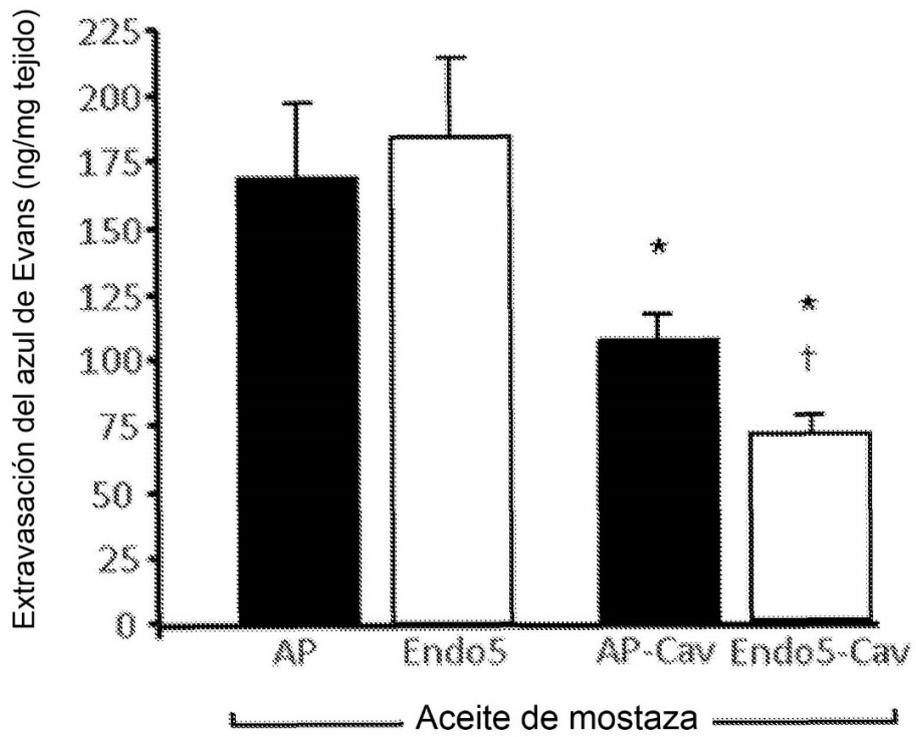


Fig. 3B

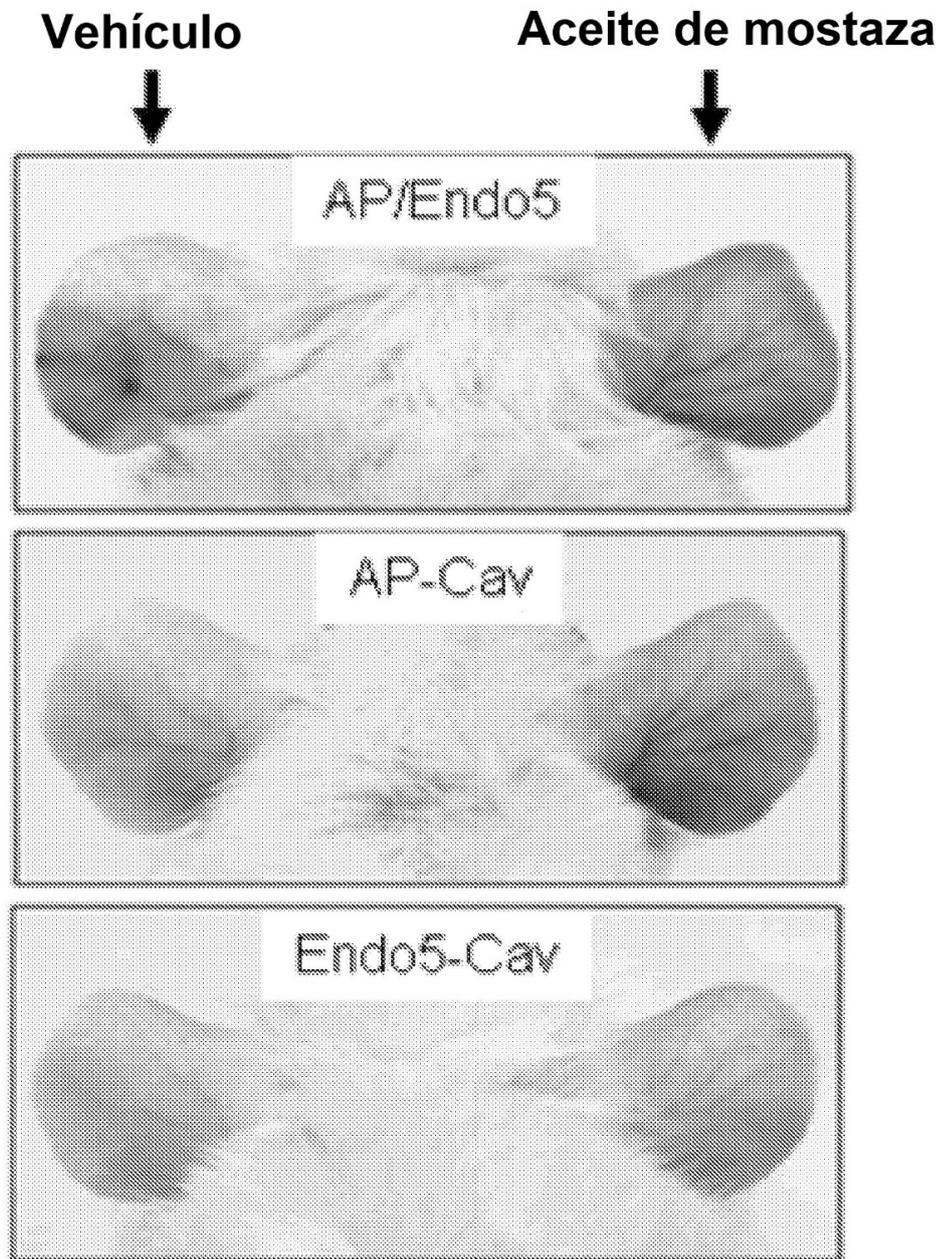


Fig. 4A

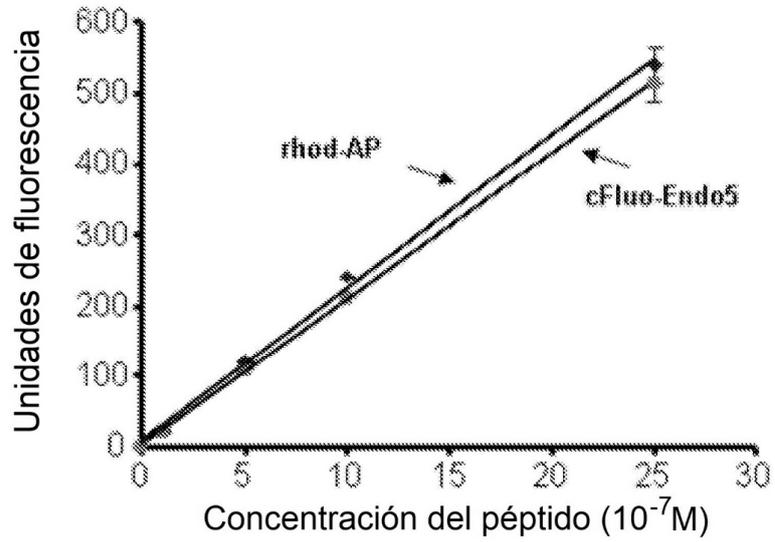


Fig. 4B

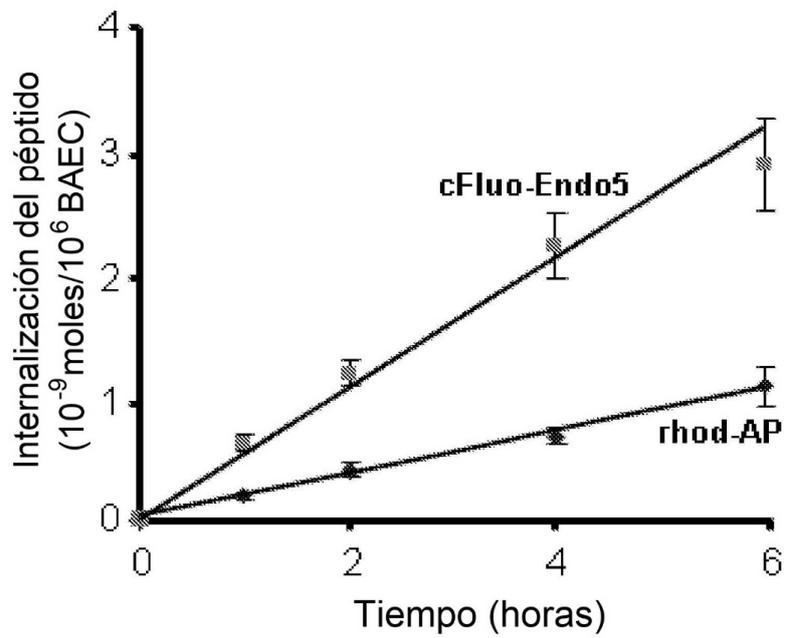
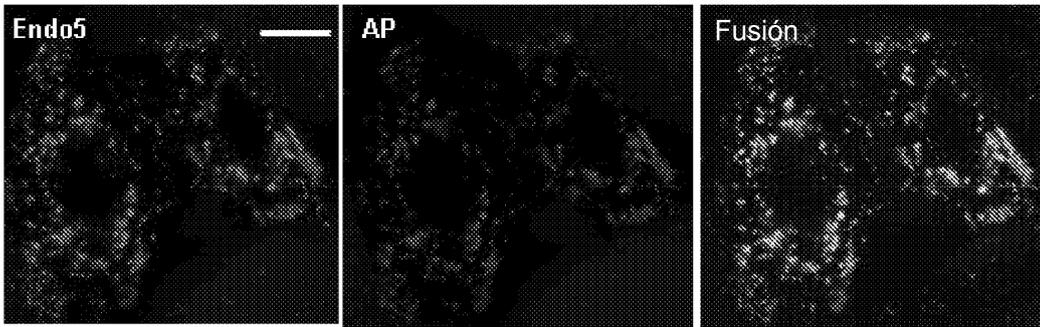
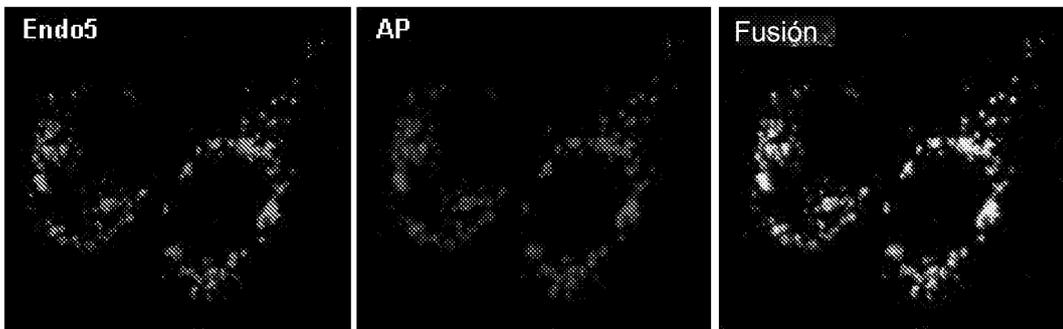


Fig. 5A



HUVEC vivas - pulso 1 h

Fig. 5B



HUVEC vivas - Seguimiento 3 h

Fig. 5C

