



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 420**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06765092 .9**
96 Fecha de presentación : **24.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1907544**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Péptidos aptos para translocación en una membrana.**

30 Prioridad: **22.07.2005 GB 0515115**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **ISOGENICA Ltd.**
The Mansion Chesterford Research Park
Little Chesterford CB10 1XL, GB

72 Inventor/es: **Coomber, David;**
Fitzgerald, Kevin;
McGregor, Duncan;
Ullman, Chris y
Leanderson, Tomas

74 Agente: **García Egea, Isidro José**

ES 2 360 420 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

Péptidos aptos para translocación en una membrana

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 Esta invención se relaciona con métodos para el aislamiento de compuestos novedosos denominados péptidos aptos para translocación en una membrana (PTMs). Tales PTMs se caracterizan por la capacidad para transportar tanto a sí mismos como a grupos no aptos para translocación asociados con las membranas a lo largo de los PTM.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La capacidad de comunicación de ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, amino ácidos, pequeñas moléculas, virus, etc. (de aquí en adelante referidos colectivamente como "grupos no aptos para translocación") al interior de células o tipos celulares específicos es útil para diversas aplicaciones en oncología, biología del desarrollo, terapia génica y en la comprensión general del modo de operación de proteínas concretas, ácidos nucleicos y pequeñas moléculas en un sistema
- 15 tipo. La mayoría de las proteínas y péptidos terapéuticamente importantes no se trastocan fácilmente a lo largo de membranas biológicas. Sin embargo, algunos factores de transactivación y homeoproteínas han mostrado ser aptos de facilitar la translocación en membranas, incluyendo los péptidos derivados de Tat (Fawell et al., 1994, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 91:664-668), la tercera hélice de la proteína con homeodominio antenapedia (Derossi et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:10444-10450; Patentes estadounidenses números 5.888.762 y 6.015.787), y VP22 (Schwarze et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.* 21:45-48). Tales péptidos derivados naturalmente están a menudo aislados en vesículas de membranas dentro del citoplasma de la célula, que, a menudo, impide que el grupo no
- 20 apto para translocación asociado acceda a su objetivo deseado (Potocky et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278: 50188-94).

- 25 Se ha informado previamente de la existencia de una serie de grupos aptos para traslocación en una membrana (por ejemplo, péptidos). Por ejemplo, la patente mundial WO 01/27154 describe un péptido específico apto para traslocación en una membrana en toda su longitud (PTML), que es apto de incrementar el movimiento de un agente activo o de una partícula activa a lo largo de la membrana de un lípido, tal como en el interior de una célula, dentro o fuera de un compartimiento intracelular y a lo largo de una capa celular.

- 30 La patente mundial WO 99/49879 describe una secuencia de péptido artificial apto para translocación en una membrana (SPTM), que se usa para facilitar la entrada de poli péptidos, dominios de proteínas, o proteínas en toda su extensión a través de una membrana celular. Se discuten también los métodos de uso de esta secuencia para proteínas obra de ingeniería genética con permeabilidad de membrana celular.

- 35 La patente estadounidense 2004/197867 describe poli péptidos de fusión que comprenden dominios de transducción de proteínas y poli péptidos osteoinductivos, que pueden ser usados para inducir la osteogénesis y para promover la síntesis de proteoglicanos. También se describen vectores de expresión que pueden ser usados para expresar los poli péptidos de fusión, y métodos de uso de los poli péptidos para inducir formación ósea.

- 40 PERSSON et al. (2003) *Biochemistry*, 42 (2): 421-429, describe un análisis utilizado para medir el enlace de péptido apto para translocación en una membrana, penetrando liposomas con carga negativa.

- 45 La patente mundial WO 02/088318 describe un complejo lipídico para la liberación de moléculas de ácido nucleico biológicamente activas a células *in Vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Para promover la liberación de la molécula de ácido nucleico activo, el complejo lipídico puede incluir un factor de orientación a la célula, tal como un péptido sintético apto para translocación en una membrana (PTM). También se indican las secuencias de péptido específico apto para translocación en una membrana.

- 50 La patente mundial WO 2004/050871 describe dos proteínas de fusión que contienen una proteína o un fragmento de proteína, un dominio de interacción, y una secuencia de translocación proteínica, que provoca que las proteínas de fusión sean translocadas por la membrana citoplásmica cuando se expresen en una bacteria.

- 55 La patente mundial WO 00/58488 describe métodos para la modulación de procesos celulares por contacto de una célula con una molécula de modificación de proceso celular adosada a un poli péptido de translocación. Un gen específico puede ser transferido por adosado de un poli nucleótido en particular (que contiene el gen específico) a un poli péptido de translocación. Alternativamente, puede ser transferido un agente regulatorio para un gen específico en particular por adosado del agente regulador a un poli péptido de translocación.

La patente mundial WO 2004/081188 describe composiciones para transportar a lo largo de una membrana biológica que comprenda un péptido LMWP de traslocación en membrana y una molécula de carga. El péptido LMWP puede ser unido, adosado, fusionado o asociado de otra forma con la molécula de carga. También se divulgan algunos péptidos LMWP específicos, tales como los de péptidos de protamina digerida en termo lisina purificada.

La patente mundial WO 2005/017188 describe proteínas de fusión que incluyen un péptido apto para translocación en una membrana y una proteína IKB inhibitoria que pueden ser usados para inhibir la cascada NF-KB en el interior de una célula. La secuencia del péptido apto para translocación en una membrana comprende al menos ocho residuos consecutivos de una secuencia específica de péptido.

TSENG et al. (2002), *Molecular Pharmacology*, 62 (4): 864-872, hace referencia a la translocación de liposomas en células cancerígenas por péptidos que penetran en células, penetratina y TAT; y describe un estudio cinético y de eficacia de los mismos.

TORCHILIN et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(15): 8786-8791, describe liposomas que tienen el péptido TAT en la superficie para su uso en la liberación molecular.

Sin embargo, ninguno de los documentos *supra* describe o sugiere cómo los péptidos aptos para translocación en una membrana pueden ser seleccionados. Hasta la fecha, los péptidos novedosos habían sido conseguidos a través del uso de dos planteamientos diferentes. El primer enfoque produce aspirantes a péptidos por la síntesis química de una genoteca elegida al azar de 6-10 péptidos aminoácidos (J. Eichler et al, 1995, *Med. Res. Rev.*, 15:481-496; K. Lam, 1996, *Anticancer Drug Des.*, 12: 145-167; M. Lebl et al, 1997, *Methods Enzymol.* 289:336-392). En el segundo planteamiento, los aspirantes a péptidos son sintetizados por clonación de una genoteca de nucleótidos elegida al azar dentro de un gen fagocítico filamentoso Ff, que permite que péptidos de un tamaño mucho mayor se manifiesten en la superficie del bacteriófago (H. Lowman, 1997, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:401-424; G. Smith et al., 1993, *Meth. Enz.* 217:228-257). Se han hecho también genotecas de péptidos elegidos al azar de hasta 38 amino ácidos de longitud, y es probable conseguir péptidos más largos usando este sistema. Las bibliotecas de péptidos que se producen usando cualquiera de estas estrategias se mezclan generalmente con una proteína específica preseleccionada ligada a la matriz. Se eluyen los péptidos vinculadores, y sus secuencias son especificadas. Se sintetizan nuevos péptidos a partir de esta información y sus propiedades biológicas se especifican. El despliegue fagocítico se ha usado previamente para identificar péptidos que se trastocan, pero son relativamente pocos los péptidos que han sido aislados por este método, y los que lo han sido son generalmente de un tipo celular específico y requieren endocitosis para la entrada en una célula (Gao et al., 2002, *Bioorg. Med Chem.*, 10: 4057-65). Una desventaja asociada con los péptidos del estado de la técnica previo que dependen de la endocitosis para cruzar la membrana celular es que, generalmente, tal mecanismo resulta en la entrega del péptido que se transloca, y cualquier grupo no translocador asociado, a endosomas donde ambos son destruidos sin causar el efecto celular deseado.

Una desventaja ulterior del estado de la técnica es que el tamaño de las genotecas que pueden ser generadas tanto con expresión fagocítica como con síntesis química se limita al intervalo comprendido entre 10^6 - 10^9 . Esta limitación ha resultado en el aislamiento de péptidos de afinidad relativamente baja, a menos se use subsiguientemente un proceso de maduración que exige tiempo. Esta limitación en el tamaño de genoteca ha llevado al desarrollo de técnicas para la generación *in vitro* de genotecas de péptidos que incluyen expresión de ARNm (Roberts, & Szostak, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-12302), expresión de ribosoma (Mattheakis et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9022-9026) y expresión CIS (Odegrip et al., 2004; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2806-2810), entre otros. Estas genotecas son superiores a las genotecas de expresión fagocítica en las que el tamaño de las genotecas generadas por tales métodos es de un orden de magnitud 2-3 mayor que el posible con expresión fagocítica. Esto es porque, a diferencia de técnicas como la expresión fagocítica, no hay intermediario en las fases *in vivo*.

Sin embargo, en el momento presente, no se ha descrito ningún método usando sistema de despliegue *in vitro* conocidos que permitan la identificación específica y selectiva de péptidos aptos para translocación en membrana (PTMs). Además, tales métodos podrían permitir la identificación de PTMs aptos de cruzar capas celulares, tales como el endotelio.

Por tanto, permanece una necesidad de métodos que pudieran proporcionar un avance muy necesitado en el campo del descubrimiento de PTM y en el desarrollo de drogas a base de péptidos.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para la selección de compuestos novedosos, a los que nos referimos como péptidos aptos para traslocación en membrana o PTMs, que son aptos para translocarse, a sí mismo y a un grupo no apto para traslocación, a lo largo de membranas

lipídicas tales como membranas celulares. Los PTMs de la presente invención se seleccionan por su aptitud para internalizar, de forma eficiente, grupos asociados, en el interior de compartimientos encapsulados en membranas, incluyendo una amplia variedad de tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*. El PTM identificado de la invención puede comprender también una molécula útil para diagnóstico o fines terapéuticos.

De forma acorde, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para el aislamiento de un compuesto que exhibe una actividad de traslocación de membrana a partir de una genoteca de expresión de péptidos, comprendiendo dicha genoteca una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos que codifican péptidos expresados, comprendiendo las etapas de:

a) Expresión de una pluralidad de construcciones de ácido nucleico,

en donde cada construcción de ácido nucleico comprende una secuencia promotora operativamente vinculada a la secuencia de ácido nucleico, de tal forma que dicha expresión de la pluralidad de construcciones de ácido nucleico resulta en la formación de una pluralidad de complejos de péptido-ácido nucleico, comprendiendo cada complejo al menos un péptido expresado asociado con la construcción correspondiente de ácido nucleico que codifica el péptido expresado;

b) Exposición de los complejos de péptido de ácido nucleico a una población de uno o más tipos de células y permisión de que tenga lugar una reacción de translocación;

c) Eliminación de cualesquiera complejos de péptido de ácido nucleico que permanezcan sin asociar con el uno o más tipos de células; y

d) Recubrimiento de cualesquiera complejos de péptido de ácido nucleico del interior de las células y caracterización del péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico como comprensivo de un péptido apto para traslocación en una membrana (PTM), en donde la genoteca de expresión de péptido es una genoteca de expresión de péptido *in Vitro*.

En una realización alternativa, el compartimento encapsulado en la membrana es, preferentemente, una vesícula lipídica. Por ejemplo, un compartimento encapsulado en lípido artificialmente constituido, tal como una micela o un liposoma. Preferentemente, la vesícula lipídica es un liposoma. Preferentemente, la membrana comprende una doble capa lipídica.

En realizaciones específicas posteriores de las invenciones *supra*, el método comprende posteriormente una etapa después de la parte de c) de eliminar los complejos de péptido de ácido nucleico ligados a la superficie del compartimento encapsulado en la membrana (por ejemplo, un liposoma o uno o más tipos de células), pero que no han sido internalizadas. Aquí, los métodos de la invención comprenden posteriormente, preferentemente, la fase de: c') eliminación de los complejos de péptido de ácido nucleico asociado a la superficie celular. Esta realización representa una mejora significativa posterior en el técnica sobre el despliegue fagocítico, en cuanto permite la diferenciación entre PTMs internalizados y ligados a la superficie. Sorprendentemente, esto incrementa significativamente el número de PTMs que pueden ser identificados después de una, dos o más rondas de selección. Verdaderamente, después de cinco rondas de sección con una genoteca de expresión CIS, 9/23 péptidos fueron identificados como PTMs (Ejemplo 1). En contraste, generalmente, en selecciones de expresión fagocítica para identificar PTMs, se identifican como PTMs cantidades muy reducidas Gao et al., 2002, *Bioorg. Med. Chem.* 10:4057-4065).

En otra realización, la actividad de translocación en membrana del PTM seleccionado no implica ni exige endocitosis. Preferentemente, el PTM es apto para cruzar la membrana o membranas objeto en la ausencia de un mecanismo endocitótico. Así, en un método preferente, el uno o más tipos de células no son aptas para la endocitosis, como sucede con un hematíe.

La invención se relaciona con un PTM obtenido directamente por los métodos de la invención. Preferentemente, el PTM es un péptido aislado. La invención se relaciona además con derivados de los PTMs a los que la invención está vinculada, asociada, adosada/fusionada a otro compuesto, como se detalla *infra*. De forma ventajosa, el medio de vinculación, asociación, adoso o fusión es de adhesión inmediata por medio de una reacción enzimática u otro proceso químico / degradación.

Es preferible si el hecho de la translocación de la membrana es unidireccional al menos con relación a una parte del compuesto que se transloca a lo largo de la membrana. Esto es ventajoso porque es posible que el PTM pueda ser apto para la translocación tanto dentro como fuera de un compartimento encapsulado en una membrana. Así, una vez que el PTM se ha translocado dentro del compartimento encapsulado en la membrana, al menos una parte del péptido permanece en el interior del compartimento. La parte del péptido que permanece dentro del compartimento puede ser el propio grupo PTM, el grupo asociado no apto para translocación, o tanto el PTM como el grupo no apto para translocación. Preferiblemente, al menos el grupo no apto para translocación permanece en el interior

del compartimento encapsulado en la membrana, tal como una célula objetivo. En consecuencia, un PTM puede estar vinculado a, asociado con, adosado o fusionado a un grupo no apto para translocación (por ejemplo, por medio de un enlace adhesivo), y después de translocarse en el interior del compartimento encapsulado en la membrana, el péptido no apto para traslación es liberado del PTM al interior del compartimento o célula. De forma conveniente, la liberación del grupo no apto para translocación se produce por medio de una adherencia enzimática o un proceso químico, por ejemplo, degradación química, como se discute posteriormente *Infra*.

La invención proporciona posteriormente moléculas terapéuticas que comprenden un PTM, directamente obtenido por los métodos de la invención, fusionado a o vinculado funcionalmente a una molécula terapéutica, tal como un péptido terapéutico o ácido nucleico. De forma conveniente, la molécula terapéutica es un grupo no apto para translocación como se discutió *supra*, incluyendo cualquier compuesto útil como agente terapéutico o diagnóstico.

Ejemplos no limitativos de grupos no aptos para translocación y moléculas terapéuticas viables incluyen ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas si ARN), enzimas, hormonas, cito cinas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos de péptidos (por ejemplo, péptidos reconocidos por anticuerpos), analgésicos, antipiréticos, agentes anti – inflamatorios, antibióticos, agentes antivíricos, drogas anti – fúngicas, drogas cardiovasculares, drogas que afectan a la función renal y al metabolismo electrolítico, drogas que actúan sobre el sistema nervioso central y drogas quimioterapéuticas, por nombrar sólo unos pocos.

La invención se relaciona posteriormente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un PTM directamente obtenido por un método de la invención, codificando opcionalmente, de forma ulterior, un péptido o grupo no apto para translocación y comprendiendo posteriormente, de forma opcional, secuencias de ácido nucleico regulador. Puede ser también directamente obtenido por un método de la invención un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

La invención se relaciona, posteriormente, con una composición obtenida directamente por un método de la invención (por ejemplo, una composición terapéutica) que comprende un compartimento encapsulado en membrana, tal como un liposoma, y un PTM de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la composición ulterior comprende un grupo no apto para translocación fusionado al PTM. Más preferiblemente, el grupo no apto para translocación es una molécula terapéutica. Aún más preferiblemente, la composición terapéutica se prepara por la adición de una o más moléculas terapéuticas o PTMs de acuerdo con la invención, o ambos, a una preparación de uno o más liposomas, y permitiendo que tenga lugar un acto de translocación.

Las genotecas PTM usadas de acuerdo con la presente invención se componen de, por ejemplo, péptidos o derivados de péptidos tales como miméticos de péptidos o análogos a péptidos compuestos de amino ácidos naturales o no. De acuerdo con la invención, los péptidos aptos para translocación en membrana (PTMs) aislados por la invención son, preferiblemente, secuencias de amino ácidos no naturales que son capaces de cruzar o extenderse sobre una membrana lipídica, y, preferiblemente, una doble capa lipídica.

Generalmente, los PTMs obtenidos directamente por los métodos de la invención son aptos para cruzar la membrana objeto, de tal forma que el péptido es liberado en el interior de la masa intra – membrana, esto es, el citosol de una célula o la masa interna de un liposoma. Sin embargo, en algunos casos el PTM puede, simplemente, insertarse en la membrana objeto, de tal forma que se extienda sobre la membrana. En este caso, al menos una parte del PTM está en el interior de la membrana y, preferiblemente, al menos, bien una parte del PTM y/o un grupo asociado no apto para translocación están dentro del volumen del interior de la membrana. Preferiblemente, el PTM directamente obtenido por los métodos de la invención es capaz de cruzar la membrana objeto y entrar en el citoplasma de una célula, por ejemplo, un hematíe. Preferiblemente, el PTM es una secuencia de amino ácido no natural de entre alrededor de 2 a 25 amino ácidos o de entre alrededor de 8 a 20 residuos de amino ácidos.

Tales compuestos son seleccionados preferiblemente por los métodos de la invención para entrar en el compartimento encapsulado en la membrana, por ejemplo, una célula de interés, mientras que permanece vinculado al ácido nucleico codificador, de tal forma que el ácido nucleico es también transferido al interior de la célula.

Ejemplos específicos de tales compuestos que pueden ser identificados por los métodos de la invención incluyen péptidos lineares o cíclicos, preferiblemente entre 2 y 25 amino ácidos o entre alrededor de 8 y 20 residuos de amino ácidos de longitud, y combinaciones de los mismos, opcionalmente modificados en el N-término o C-término o ambos, además de sus sales y derivados, los análogos funcionales de los mismos y cadenas de péptidos extendidos portando amino ácidos o poli péptidos en los términos de las secuencias.

De acuerdo con la invención, las genotecas de expresión de péptidos *in Vitro* son generadas por medios adecuados conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden ser adecuadamente generadas genotecas de complejos de péptido de ácido nucleico generado *in vitro*, por un método apropiado tal como el descrito por Roberts, & Szostak, (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-12302), Mattheakis et al., (1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9022-9026), Odegrip et al., (2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 2806-2810) y por la patente WO2004/022746. En ciertos casos, como aquellos en los que el tamaño máximo de la genoteca está dentro de los límites de la síntesis química, este método puede ser usado de forma alternativa. Las genotecas de complejos de péptido de ácido nucleico generado *in Vitro* son seleccionadas entonces de acuerdo con su aptitud para translocarse a lo largo de (o, al menos, extenderse sobre) una membrana objeto, por ejemplo una membrana de un tipo celular de interés.

En otra fase del método de la invención, los miembros de la genoteca que codifican PTMs son ulteriormente seleccionados por la eliminación de complejos de péptidos de ácido nucleico que codifican péptidos no aptos para translocación en membrana a partir de la superficie de la membrana o célula objeto con un nucleasa o proteasa adecuada o una combinación de ambas. Los PTMs capaces de cruzar una membrana y, en consecuencia, entrar en una célula o vesícula (por ejemplo, un liposoma) y transferir el grupo de ácido nucleico asociado al interior de la célula pueden ser recuperados y caracterizados entonces. La invención también posibilita la selección de un complejo de péptido de ácido nucleico que codifica un PTM vinculado a dos o más PTMs o cualquier otra combinación que pueda ser concebida por un experto en la materia. Por ejemplo, uno o más (preferiblemente, cada uno) de los miembros de la genoteca de secuencias de ácido nucleico puede codificar 2, 3, 4 ó más PTM o secuencias potenciales de PTM. La invención posibilita ulteriormente la sección de un complejo de péptido de ácido nucleico que codifica un PTM vinculado a dos o más grupos no aptos para translocación.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el que se entiende habitualmente por un experto medio en la materia a la que pertenece esta invención.

La invención es ilustrada ulteriormente por los dibujos que se acompañan, en los que

La Figura 1 muestra un análisis FACS y de microscopio fluorescente de células Jurkat no fijadas. Los péptidos 7, 13 y 19 son ejemplos de péptidos aptos para traslación en membrana aislados por el método. El péptido 24 es un péptido epítipo FLAG de control negativo.

La Figura 2 muestra una comparación de secuencias de péptidos entre un péptido apto para translocación en membrana seleccionado de acuerdo con el método de la invención el grupo conocido, apto para translocación en membrana, HIV-TAT.

Con objeto de ayudar a la comprensión de la invención, se definen aquí varios términos.

Los términos "péptido", "péptido apto para translocación en membrana" o "PTM", tal como se usan aquí, hacen referencia a una pluralidad de amino ácidos agrupados en una cadena lineal, incluyendo un di péptido, tripéptido, oligopéptido y poli péptido. Un di péptido contiene dos amino ácidos; un tripéptido contiene tres amino ácidos; y el término oligopéptido se usa generalmente para describir péptidos con entre 2 y alrededor de 50 o más amino ácidos. Péptidos mayores de alrededor de 50 son a menudo designados como poli péptidos o proteínas. A los fines de la presente invención, los términos "péptido" y "péptido apto de translocación en membrana" o "PTM" no se limitan a un número en concreto de amino ácidos. Preferiblemente, sin embargo, contienen de alrededor de 2 a alrededor de 50 amino ácidos o de alrededor de 2 a alrededor de 40 amino ácidos, más preferiblemente de alrededor de 2 a alrededor de 30 amino ácidos a de alrededor de 2 a alrededor de 25 amino ácidos. Por ejemplo, un PTM identificado de acuerdo con los métodos de la invención puede ser de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 amino ácidos de longitud. Generalmente, un dominio de una proteína que se extiende sobre una membrana es de 22 a 25 amino ácidos de longitud, y, por tanto, especialmente cuando el PTM se extiende en lugar de cruzar una membrana objeto, el PTM puede ser de 22, 23, 24 ó 25 amino ácidos de longitud.

El término "Péptidos aptos para translocación en membrana" (PTMs), tal y como se usa aquí, designa secuencias de amino ácidos (como las descritas *supra*) que pueden contener residuos de amino ácidos, naturales o no. En consecuencia, los llamados "miméticos de péptidos" y "análogos de péptidos", que pueden incluir estructuras químicas no amino ácidas que mimetizan la estructura de un amino ácido o péptido en concreto, pueden ser también "péptidos aptos para translocación en membrana" dentro del contexto de esta invención. Tales miméticos o análogos se caracterizan generalmente por exhibir unas características físicas similares, como el tamaño, carga o hidrofobicidad, y la orientación espacial apropiada que se encuentra en sus contrapartes de péptidos naturales. Un ejemplo específico de un compuesto de péptido mimético es un compuesto en el que el enlace de la amida entre uno o más de los amino ácidos es reemplazado, por ejemplo, por un enlace de carbono reforzado con fibra de carbono u otro enlace no amida, como es notorio en el estado de la

técnica (ver, por ejemplo, Sawyer, en *Peptide Based Drug Design*, pp. 378-422, ACS, Washington D. C. 1995).

5 La presente invención se dirige hacia la identificación y caracterización de PTMs de entre una población (o genoteca) de péptidos – esto es, PTMs potenciales o putativos que pueden ser expresados de una genoteca de secuencias de ácido nucleico. Aunque el término “péptido” es el usado aquí, se entiende que la presente invención no limita la identificación de PTMs o dominios y motivos más grandes de péptidos a los que, en una nomenclatura convencional, quizás fuera más apropiado llamarlos poli péptidos o proteínas.

10 Ulteriormente, el término “péptido apto para translocación en membrana” (PTM) puede incluir péptidos que cruzan una membrana de tal forma que el PTM y cualesquiera grupos asociados no translocadores pasan de un lado a otro de la membrana, y péptidos que, simplemente, “se extienden” sobre la membrana objeto. Por “extenderse” se entiende que un PTM puede insertarse en (o penetrar) la membrana objeto de tal forma que, al menos, una parte del PTM permanece en el interior de la membrana. Así, por ejemplo, un PTM seleccionado por los métodos de la invención puede extenderse sobre la membrana objeto provocando que una parte del PTM permanezca en el interior de la membrana (o capa doble lipídica) y una parte del PTM o un grupo no translocador asociado sea internalizado (esto es, se encuentre en el interior de la respectiva vesícula o célula). Sin embargo, preferiblemente, un PTM directamente obtenido de acuerdo con los métodos de la invención cruza una membrana objeto, pasando de un lado de la membrana al otro. En una forma, un PTM obtenido directamente de acuerdo con los métodos de la invención es apto para cruzar una pluralidad de membranas, tal como una pluralidad de capas de células Caco-2 o epitelio, de tal forma que el PTM es capaz de moverse de un lado del tejido al otro, o en el interior de la capa de tejido.

25 Por “derivado” de un PTM se entiende una secuencia de péptido apta para translocarse ella misma y, opcionalmente, también un grupo no – translocador asociado / fusionado, a través de una membrana objeto, pero que comprende una o más mutaciones o modificaciones a la secuencia de péptido primario de un PTM identificado por los métodos de la invención. Así, un derivado de un PTM puede tener una o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 ó más cadenas laterales de amino ácidos químicamente modificadas, que hayan sido introducidas en el interior de un PTM de la invención. Adicional o alternativamente, un derivado de un PTM puede contener uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 30 4, 5 ó más mutaciones, sustituciones o deleciones de amino ácidos a la secuencia primaria de un PTM de la invención. Así, se prevé que la invención permita que los resultados de los experimentos de maduración practicados sobre un PTM mejoren una o más características del PTM. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó más residuos de amino ácidos de una secuencia PTM puedan ser mutados al azar o de forma específica usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, por modificación de la secuencia codificada de ADN o ARN), y la resultante genoteca / población de péptidos derivados puede ser seleccionada de acuerdo con requisitos pre – determinados (tal como la translocación mejorada en un tipo celular en concreto; o la selectividad mejorada de un tipo celular concreto), por cualquier método conocido en el estado de la técnica. Los péptidos seleccionados que exhiben una aptitud para la translocación en membrana son derivados de PTMs y se prevén aquí.

40 El término “membrana” en el contexto de la frase “translocación en membrana”, incluye las membranas de cualquier membrana natural o artificial que comprende una capa única o una doble capa de moléculas alifáticas, tales como moléculas de ácido graso o moléculas lipídicas. Así, el término incluye las membranas de micelas, liposomas, u otras vesículas conocidas por el experto en la materia, y cualquier tipo de célula natural, incluyendo las bacterianas, fúngicas, vegetales, animales o humanas, por ejemplo, células sanguíneas (por ejemplo, hematíes) o células epiteliales, incluyendo células cutáneas y células de la pared intestinal. Preferentemente, la membrana es una doble capa lipídica y encapsula un liposoma artificial o una célula no endocitótica.

50 El término “grupo no apto para translocación”, usado aquí, se refiere a una entidad que no puede atravesar por sí misma una membrana, tal como un lípido de capa única, doble capa o membrana celular; o a un grupo que no puede por sí mismo atravesar tal membrana de forma lo suficientemente efectiva como para provocar el efecto intracelular deseado. Tal grupo no translocador incluye ácidos nucleicos y otros polímeros, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos de péptidos (ANPs), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y pequeñas moléculas de membrana impermeable, entre otros. Preferentemente, un grupo no apto para translocación es una molécula terapéutica, que es descrita ulteriormente *infra*.

60 El término “aminoácido” se usa en el ámbito de la presente invención en su más amplio sentido y tiene por objeto incluir tanto los L α-aminoácidos o los residuos. Aquí se usan las abreviaciones de una y tres letras comúnmente usadas para los aminoácidos naturales (Lehninger, A. L., (1975) *Biochemistry*, 2d ed., pp. 71-92, Worth Publishers, Nueva York). La correspondencia entre los códigos de letra única normalizados y los códigos de tres letras normalizados es conocida por el experto en la materia, y se reproduce aquí; A=Ala; C=Cys; D=Asp; E=Glu; F Phe; G=Gly; H His; I=Ile; K=Lys; L=Leu; M=Met; N=Asn; P=Pro; Q=Gin; R=Arg; S=Ser; T=Thr; V=Val; W=Trp; Y=Tyr. El término

genérico “aminoácido” incluye ulteriormente D-aminoácidos además de aminoácidos modificados químicamente tales como análogos de aminoácidos, aminoácidos naturales que no están normalmente incorporados a proteínas tales como la norleucina, y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en el estado de la técnica como características de un aminoácido. Por ejemplo, los análogos o miméticos de fenilalanina o prolina, que permiten la misma limitación conformacional de los compuestos de péptidos como lo hacen el Phe o el Pro naturales, se incluyen en la definición de aminoácido. Tales análogos y miméticos son aludidos aquí como “equivalentes funcionales” del aminoácido respectivo. Otros ejemplos de aminoácidos están listados por Roberts y Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meiehofer, eds., Vol. 5, pág. 341, Academic Press, Inc., Nueva York, 1983.

La presente invención se dirige hacia la identificación y caracterización de PTMs de entre una población (o genoteca) de péptidos – esto es, PTMs potenciales o putativos. En especial, los PTMs son seleccionados usando una expresión de genotecas de péptidos generadas *in Vitro*.

Los términos “expresión *in Vitro*”, “expresión de péptidos *in Vitro*” y “genotecas generadas *in Vitro*” se usan aquí para aludir a sistemas en los que las genotecas de péptidos se expresan de tal forma que los péptidos expresados se asocian con los ácidos nucleicos que los codifican, y en los que tal asociación no sigue la transformación de células o bacterias con dichos ácidos nucleicos. Tales sistemas contratan con el despliegue fagocítico y otros sistemas de “despliegues *in Vitro*” en los que la asociación de péptidos con sus ácidos nucleicos codificados sigue la transformación de células o bacterias con los ácidos nucleicos.

Los péptidos aptos para translocación en membrana, usados en el contexto de la presente invención, pueden ser “conjugados” a un grupo no apto para translocación. El término “conjugado” se usa en su sentido más amplio para abarcar todos los métodos de adosado o unión que se conocen en el estado de la técnica. Por ejemplo, el grupo no apto para translocación puede ser una extensión aminoácida del término C- ó N- del PTM. Adicionalmente, una secuencia de enlace de aminoácido corta puede estar entre el PTM y el grupo no apto para translocación. La invención se refiere ulteriormente a moléculas a las que puede enlazar el PTM, por ejemplo, por conjugación química al grupo no apto para translocación por medio de una secuencia de enlace. Generalmente, el PTM será enlazado al grupo no apto para translocación por medio de una zona en el grupo no apto para traslación que no interfiere con la actividad del grupo no apto para translocación. Aquí, otra vez, el PTM se considera como “conjugado” al grupo no apto para translocación. Opcionalmente, este enlace puede ser roto bajo condiciones de reducción que se dan en el citoplasma de las células después de la internalización.

El término “conjugado”, usado aquí, se usa de forma intercambiable con los términos de “enlazado”, “asociado” o “adosado”. El experto en la materia conoce un amplio intervalo de formas covalentes y no covalentes de conjugación, y caen dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, enlaces de disulfuro, vinculaciones químicas y cadenas de péptidos, son, todas ellas, formas de enlaces covalentes. Cuando se prefiere un medio no covalente de conjugación, los medios de adosamiento pueden ser, por ejemplo, un enlace de biotina-(estrepto) avidina o similar. Interacciones de anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) con Antígenos pueden ser también convenientemente utilizadas para conjugar un PTM de la invención con un grupo no apto para translocación. Un emparejamiento anticuerpo – antígeno adecuado es la interacción fluorescencia – antifluorescencia.

De esta forma, puede ser elaborado un sistema de liberación unidireccional y enfocado al objetivo, en el que los medios de conjugación entre un PTM y un grupo no apto para translocación se rompe o se adhiere preferentemente una vez que el PTM y su grupo no apto para translocación asociado (o, al menos, el grupo no apto para translocación en sí mismo) ha cruzado la membrana objeto. Puede ser usada cualquier combinación adecuada de medios de conjugación y de sistema de adherencia, tales como adherencia enzimática, competencia vinculante, radiación y similares. Preferiblemente, cuando la membrana objeto es una membrana celular (de tal forma que el grupo no apto para translocación es liberado en el interior de una célula), el medio de conjugación es un enlace peptídico que puede ser adherido por una enzima, preferiblemente una enzima endógena, en el interior de la célula (por ejemplo, en el citoplasma). Alternativamente, la conjugación es, preferiblemente un puente de di – sulfuro que puede ser prontamente adherido por el ambiente intracelular menguante de la célula. Cuando el compartimiento encapsulado en la membrana no es una célula, por ejemplo, cuando es una vesícula lipídica, un liposoma o similar, puede ser preferible usar una combinación alternativa de medio de conjugación y medio de adherencia. Nuevamente se puede usar cualquier medio adecuado, siempre que (si se desea) el grupo no apto para translocación puede ser liberado unidireccionalmente al interior del compartimento.

El grupo no apto para translocación puede o puede no ser activo en la forma conjugada pero, en cualquier caso, está, preferiblemente, activo después de ser desasociado del PTM (esto es, una vez que ha sido rota la conjugación).

La presente invención representa un avance significativo en la técnica del desarrollo de drogas peptídicas al permitir la selección de genotecas generadas *in Vitro* para propiedades de translocación en membrana. Las genotecas de ácido nucleico generadas *in Vitro* que codifican una pluralidad de péptidos son sintetizadas y seleccionadas inicialmente para enlazamiento, penetración (esto es, extensión de membrana) o internalización en una célula objeto o población de liposoma. Los miembros de genotecas incapaces de asociarse con una célula objeto o liposoma en una o más de las vías expuestas *supra* son eliminados por lavado u otros métodos apropiados conocidos por los expertos en la materia. A modo de ejemplo, las células, liposomas (u otros compartimentos encapsulados en membranas objeto) lo suficientemente densos, pueden ser centrifugados a través de una capa no acuosa de aceite para separar los miembros de genotecas asociadas a membranas de los miembros de genoteca no asociadas. Preferiblemente, el aceite es aceite mineral. Otros aceites que pueden ser adecuados incluyen los aceites con una gravedad específica inferior a la del agua. En este aspecto, el aceite mineral tiene una densidad específica de 0.84 g/ml a 25° C. Preferiblemente, las células tales como los hematíes están separadas de miembros de genotecas no asociadas por centrifugado a través de aceite mineral. Como ya se señaló *supra*, un PTM puede penetrar o cruzar la membrana objeto. Los miembros de genotecas que codifican un PTM o péptido enlazante de superficie permanecerán enlazados al objeto o internalizados en la célula durante esta fase.

Los miembros de genotecas enlazadas en superficie son eliminados entonces de la superficie celular por una proteasa no específica tal como la tripsina, o una nucleasa tal como DNaseI, o una combinación de ambas, o por cualquier otro método conocido por el experto en la materia. Sólo los miembros de genotecas que codifiquen un PTM permanecen dentro de la población celular.

Los PTMs internalizados son recobrados entonces y caracterizados individualmente por secuenciar el ácido nucleico asociado, y, por ejemplo, expresar o sintetizar el PTM codificado para confirmar las propiedades deseadas de traslación en membrana. La localización sub – celular eventual del PTM puede ser también determinada. Como se señaló *supra*, tal fase (esto es, la eliminación de los PTMs de miembros de genoteca enlazados a la membrana), no es posible con genotecas de expresión de fagocitos como lo son las naturalmente resistentes a las proteasas tales como la tripsina (ver, por ejemplo, la patente mundial WO-A-99058655), y una nucleasa no puede ser utilizada cuando el ácido nucleico del fagocito está protegido por el recubrimiento vírico. Una limitación ulterior de las genotecas de expresión de fagocitos es el enlace específico no inherente por partículas fago citicas a membranas celulares, siendo tal enlace no específico conocido a los expertos en la materia.

De forma ventajosa, los PTMs directamente obtenidos por los métodos de la invención son aislados y caracterizados individualmente. Sin embargo, puede obtenerse una población mixta de PTMs por los métodos de la invención, por ejemplo, donde más de un complejo de péptido de ácido nucleico cruza una membrana y se interna en, por ejemplo, un liposoma o célula durante los métodos de la invención. En este caso, los métodos de la invención pueden resultar en una población mixta de PTMs.

Preferiblemente, los métodos de la invención proporcionan PTMs que, sorprendentemente, pueden cruzar las membranas celulares sin endocitosis. Tales PTMs pueden ser ulteriormente seleccionados por el uso de células en una selección con mecanismo de transferencia endocitótica no conocido, tales como los hematíes, o por el uso de compartimentos encapsulados en membrana, tales como liposomas.

Opcionalmente, la invención puede ser aplicada al aislamiento de PTMs específicos de tipo celular. Las genotecas de ácido nucleico generadas *in Vitro* que codifican una pluralidad de péptidos son sintetizadas y seleccionadas para enlace o internalización a una población celular objeto de interés, tal como una población de células cancerosas, por ejemplo, después de una incubación previa con una población celular no objeto de interés, con objeto de eliminar PTMs reactivos al cruce (esto es, aquellos PTMs asociados con el tipo celular no – objeto). Los expertos en la materia conocen los medios para llevar a cabo tales métodos. Generalmente, los miembros de genotecas incapaces de enlazar con la población celular objeto de interés son eliminados por lavado u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Los miembros de genotecas enlazados en la superficie son eliminados entonces de la superficie celular por una proteasa no específica tal como la tripsina, o una nucleasa tal como DNaseI, o una combinación de ambas o por cualquier otro método conocido por el experto en la materia. Como en los métodos de la invención descritos *supra*, sólo los miembros de genotecas que codifican un PTM permanecen en la población celular. Los PTMs internalizados pueden ser recuperados entonces y caracterizados individualmente por secuenciación del ácido nucleico asociado, expresando o sintetizando el PTM codificado para confirmar las propiedades deseadas de translocación en membrana, y, posiblemente, determinando también la localización sub – celular del PTM.

La invención puede ser aplicada también al aislamiento de PTMs aptos para cruzar capas de células tales como células Caco-2 o el epitelio humano. Las genotecas de ácido nucleico generadas *in*

Vitro que codifican una pluralidad de péptidos objeto son sintetizadas y seleccionadas para enlace, penetración o internalización a una población celular objeto de interés, tal como, por ejemplo, células Caco-2 crecidas en las capas. Los miembros de genotecas no aptos para enlace a la población celular objeto de interés son eliminadas por lavado u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Preferiblemente, los miembros de genotecas ligadas a la superficie son eliminados entonces de la superficie de la célula por una proteasa no específica tal como la tripsina, o una nucleasa tal como DNaseI, o una combinación de ambas o por cualquier otro método conocido por el experto en la materia. Una y otra vez, sólo los miembros de genotecas que codifiquen un PTM permanecen en el interior de la población celular y son protegidos de la proteasa o nucleasa. Los PTMs internalizados pueden ser recubiertos entonces y caracterizados individualmente por la secuenciación del ácido nucleico asociado, y expresando opcionalmente o sintetizando el PTM codificado para confirmar las propiedades deseadas de translocación de la capa celular epitelial. Alternativamente, las células pueden estar dispuestas como mono capas sobre filtros de policarbonato y una selección puede estar hecha como se describió por Stevenson et al., (1999, *Int. J. Pharm.* 177, pp. 103-115). Las genotecas de péptidos *in Vitro* ubicadas en el lado apical de las células pueden estar recubiertas sobre el lado baso lateral si se trastocan a través de las células. Es posible el uso de dichos métodos para seleccionar PTMs que son aptos de cruzar membranas biológicas, tales como la pared intestinal y la piel.

Los PTMs aislados de esta forma son útiles como agentes de distribución oral para grupos no aptos para translocación. A modo de ejemplo, un PTM de la invención puede ser conjugado a una droga proteínica tal como la insulina y formulado en una composición farmacéutica adecuado de tal forma que, al ingresar en el intestino, el PTM produce una translocación de insulina en el sistema circulatorio sanguíneo. Como ejemplo ulterior, un PTM de la invención puede ser conjugado a una pequeña molécula y formulado en una composición farmacéutica adecuada de forma tal que al entrar en el intestino, el PTM provoca la translocación de la minúscula sustancia molecular en el sistema circulatorio sanguíneo. En otro ejemplo, el PTM puede usarse para el revestimiento de la superficie de una nano partícula que contenga una proteína, un péptido o una minúscula sustancia molecular en una composición farmacéutica adecuada de tal forma que, al entrar en el intestino, el PTM provoca la translocación de la nano partícula en el sistema circulatorio sanguíneo.

En una composición alternativa de la invención, un PTM y su grupo no objeto asociado (esto es, una molécula terapéutica) se mezcla con una población de liposomas (esto es, una vesícula lipídica u otro compartimento encapsulado en membrana artificial) para crear una población terapéutica de liposomas que contengan el PTM y la molécula terapéutica. La población terapéutica de liposomas puede ser entonces administrada a una paciente por, por ejemplo, inyección intravenosa. Cuando sea necesario para la composición terapéutica de liposomas el dirigirse de forma específica a un tipo celular específico, la composición de liposomas puede ser formulada adicionalmente con un dominio de anticuerpo o similar, que reconoce el tipo celular objetivo. Tales métodos son conocidos por el experto en la materia.

Los PTMs directamente obtenidos de acuerdo con los métodos de la invención y los PTMs conjugados con los péptidos no aptos para translocación pueden ser producidos por tecnología de ADN recombinante y procedimientos de expresión proteínica normalizada y de purificación. Así, los métodos de la invención proporcionan ulteriormente moléculas de ácido nucleico que codifican los PTMs, o moléculas terapéuticas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el ADN que codifica el péptido relevante puede ser insertado en un vector de expresión adecuado (vgr., pGEM®, Promega Corp., Estados Unidos), y transformado en una célula adecuada de alojamiento para una expresión proteínica de acuerdo con técnicas convencionales (Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Son alojamientos celulares adecuados los que puedan ser cultivados en cultivo y sean susceptibles a la transformación con ADN exógeno, incluyendo bacterias, células fúngicas y células de más alto origen eucariótico, preferiblemente células mamarias. Alternativamente, los PTMs pueden ser sintetizadas *in Vitro* usando un sistema de traducción (y transcripción) *in vitro* (por ejemplo, el sistema de extracto *E. coli* S30, Promega corp., Estados Unidos).

El término “enlazado operativamente”, cuando se aplica a secuencias de ADN, por ejemplo en un vector o construcción de expresión indica que las secuencias están dispuestas de tal forma que funcionan simbióticamente con objeto de conseguir sus objetivos, esto es, una secuencia promotora permite la iniciación de la transcripción que procede por medio de una secuencia de codificación enlazada hasta la secuencia de terminación.

Habiendo seleccionado y aislado un PTM, un grupo funcional tal como una molécula terapéutica puede ser adosado al PTM por cualquier medio adecuado. Como se discutió *supra*, un PTM puede estar conjugado con cualquier forma adecuada de molécula terapéutica, tal como un anticuerpo, enzima o pequeño compuesto químico. Una forma preferida de molécula terapéutica es una molécula si ARN apta para inducir iARN en una célula objeto. Generalmente, se usará un enlazador químico para enlazar una molécula si ARN a un péptido, tal como el PTM. Por ejemplo, el

ácido nucleico o ANP podrá ser enlazado al péptido a través de un enlace maleimida – tiolo, estando el grupo maleimida en el péptido y el tiolo en el ácido nucleico, o un enlace de di – sulfuro con un grupo de cisteína libre sobre el péptido sobre el péptido y un grupo tiolo sobre el ácido nucleico.

5 Las formulaciones y composiciones farmacéuticas obtenidas directamente por los métodos
de la invención son formuladas para cumplir con las normas regulatorias y pueden ser administradas
oralmente, intravenosamente, tópicamente o por medio de otras rutas normalizadas. Las
composiciones farmacéuticas pueden tener la forma de tabletas, píldoras, lociones, geles, líquidos,
10 polvos, supositorios, suspensiones, liposomas, micropartículas normalizadas u otras formulaciones
adecuadas que están en el estado de la técnica. Consecuentemente, se prevé el uso de un PTM
aislado por los métodos de la invención en un tratamiento terapéutico o diagnóstico. En particular, se
prevé el uso de un PTM para liberar un grupo no apto para translocación (como se describió *supra*) a
una o más poblaciones de compartimientos encapsulados en membrana. Preferentemente, el
15 compartimiento encapsulado en membrana es un liposoma o una o más poblaciones de tipos
celulares. Se prevé en particular el uso de un PTM para liberar un grupo no apto para translocación,
especialmente una molécula terapéutica, tal como una molécula si ARN, a un tipo o población celular
objeto. La célula o población celular objeto puede estar *in vivo*, esto es, en un sujeto animal o humano,
o *ex vivo*, esto es, eliminado del sujeto animal o humano para ser reintroducido allí, o, como
20 alternativa, la célula, población celular o liposoma está *in Vitro*. Puede ser usada cualquier vía de
administración conocida por el experto en la materia. En particular, debería ser usada una vía de
administración preferida para el tipo celular o población objeto. Por ejemplo, las vías de administración
preferidas al sujeto o paciente incluyen la inyección subcutánea, la ingestión o el supositorio.

A modo de ejemplo, para tratar una infección viral en un sujeto, un PTM puede ser conjugado
a un agente antivírico adecuado, y el PTM y la molécula antivírica pueden ser administrados entonces
25 al sujeto o bien por sí solas o comprendidas en un liposoma artificial, por ejemplo. De forma similar,
cuando un sujeto sufre de una enfermedad celular como el cáncer, un PTM puede ser conjugado con
una molécula/droga anticáncer apropiada, tal como una molécula si ARN u otra entidad terapéutica, y
administrada al sujeto por medio de una vía de administración apropiada. Los PTMs pueden ser
también usados para liberarse a sí mismos o a un grupo no apto para translocación a una célula
30 bacteriana. Así, una infección bacteriana puede ser tratada en un sujeto, por conjugación de un PTM
con un agente antibacteriano.

Ulteriormente, es necesario algunas veces para una composición terapéutica, tal como un
PTM conjugado a una molécula terapéutica, el ser liberado a un tipo celular o población específica en
un sujeto. Esto puede ser conseguido *ex vivo*, por ejemplo, por la adición de la composición
35 terapéutica a una población de células que han sido previamente eliminadas del sujeto o paciente.
Alternativamente, el PTM puede ser seleccionado, como se describió previamente, para translocarse
en un tipo o tipos celulares específicos, tal y como se requiere. En una alternativa ulterior, el PTM
puede ser conjugado directamente a una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por
ejemplo, Fab, F (ab)₂, scFv etc.) u otro agente adecuado de especificación, de tal forma que el PTM y
40 cualesquiera otros grupos conjugados son dirigidos a la población celular específica exigida para el
tratamiento o diagnóstico. En otra alternativa, se prevé que el PTM y su grupo no translocador
asociado puede estar comprendido en una población de liposomas, en la que los liposomas (por
ejemplo, las membranas de liposomas) comprenden adicionalmente un grupo objetivo apropiado, tal
como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los liposomas resultantes pueden ser administrados
adecuadamente al sujeto o paciente.

45 En los usos descritos *supra*, el PTM se conjuga, preferiblemente, al grupo no apto para
translocación o la molécula terapéutica por medio de una interacción que es adherible en el interior del
tipo celular objeto, por ejemplo, por medio de una adhesión enzimática o debida al ambiente
intracelular que se reduce.

La invención será ahora ulteriormente ilustrada por medio de los siguientes ejemplos.

50 **Ejemplos**

A menos que se indique de otra forma, fueron usados re agentes disponibles en el mercado y
técnicas normalizadas en biología molecular y en bioquímica.

Materiales y métodos

55 Los siguientes procedimientos usados por el presente solicitante se describen en Sambrook,
J. *et al.*, 1989 *supra*: análisis de productos de digestión de enzima de restricción sobre geles de
agarosa y preparación de un salino amortiguado con fosfato.

Fueron adquiridos re agentes para fines generales de SiGMA-Aldrich Ltd. (Poole, Dorset,
Reino Unido). Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Eurogentec Ltd. (Southampton, Reino Unido).
Los aminoácidos y extractos S30 se obtuvieron de Promega Ltd. (Southampton, Hampshire, Reino

Unido). Se obtuvieron polimerasas de ADN Vent y Taq de New England Biolabs (Cambridgeshire, Reino Unido). Se obtuvieron péptidos etiquetados FITC de Pepsican Systems (Lelystad, Países Bajos).

Ejemplo 1

(i) Construcción de una genoteca de expresión Cis para selección de PTMs

5 La construcción de una genoteca y la transcripción y translación in Vitro fueron llevadas a cabo como se describe por Odegrip et al., (2004, Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos, 101 2806-2810).

10 La construcción RCP tac-NNB-RepA-CIS-ori fue preparada por la anexión de una genoteca 18-mer NNB (donde N es cualquier nucleótido y B es o bien C, T ó G) al promotor del tac por RCP y, entonces, su vinculación a la zona RepA-CIS-ori seguida por amplificación RCP.

(ii) Selección de péptidos aptos para translocación en membrana celular

15 La transcripción y translación in Vitro fue llevada a cabo con 2 µg de ADN de genoteca en un sistema de lisis S-30 *E. coli* durante hasta 30 minutos a 30° C y, entonces, diluida con amortiguador bloqueante (1 % BSA en PBS). Generalmente, se añadieron 2 µg de ADN linear por 50 µl de lisis S-30. La genoteca expresada fue añadida a 5 µl de hematíes humanas lavadas PBS (RBC) e incubadas en hielo durante 30 minutos. Los RBC fueron centrifugados a 2000 revoluciones por minuto durante 5 minutos y el precipitado fue eliminado.

20 La bolita de RBC fue re – suspendida en 200 µl de PBS suplementado con 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl y 1 µg de DNase 1 e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células fueron lavadas una vez con PBS por centrifugado para formar una bolita suelta y, entonces, fueron re – suspendidas en 200 µl PBS. La suspensión RBC fue utilizada para recubrir 200 µl de falato de dibutilo y fue centrifugada a 11000 revoluciones por minuto durante 4 minutos. La fase acuosa fue eliminada y la bolita RBC fue suavemente pipeteada del aceite y re – suspendida en 100 µl de PBS.

25 Las células fueron sometidas a lisis en 500 µl de amortiguador PB (Qiagen) y el ADN fue purificado usando columnas de Qiagen y, entonces, re – suspendido en 50 µl de agua estéril.

En una selección paralela, la bolita RBC fue tratada con 1 µg/ml de tripsina a 37° C durante 30 minutos en lugar de DNase1, punto en el cual las células fueron giradas, el precipitado eliminado y la bolita re – suspendida en 200 µl de PBS. Las células fueron entonces giradas por medio de fetalato de dibutilo y el ADN recuperado como se describió *supra* para las células tratadas con DNase.

30 La zona de genoteca N-terminal fue amplificada separadamente de ambas selecciones y reacoplada con la RepA-CIS-ori, tal como se describió por Odegrip et al. (2004, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 101 2806-2810), para producir ADN de entrada para la próxima ronda de selección. Después de cinco rondas de selección, el ADN recuperado fue amplificado usando RCP, purificado y digerido con *NotI* y *NcoI*. El ADN fue enlazado entonces a un vector fagémido gpVIII M13 digerido en forma similar y transformado en células azules *E. coli* XL-1, y puesto en una plancha sobre planchas con 100 µg/ml de amplicina, 2 x TY, 2% de glucosa, Fueron cultivadas colonias individuales durante la noche y el ADN fagémido fue aislado y secuenciado para determinar la secuencia péptica.

(iii) Análisis de aptitud de translocación en membrana

40 Los péptidos seleccionados fueron sintetizados, marcados con FITC en el N-terminus y analizados por FACS para asociación celular usando células Jurkat. Las células Jurkat (100.000) fueron lavadas dos veces en PBS, incubadas con 1 µg de péptido marcado en 100 µl de PBS complementado con 1 % de suero fetal de ternero durante 15 minutos a temperatura ambiente, y lavado dos veces en PBS y analizado en un analizador FACS Becton Dickinson. Los péptidos asociados con células fueron vistos entonces por microscopio de fluorescencia con fijación a 45 internalización monitorizada en células.

Nueve de veintitrés péptidos fueron asociados a células. Ejemplos de estos se muestran en la figura 1.

50 La figura 1 muestra microscopía fluorescente y análisis FACS de células Jurkat no fijadas. Los péptidos (7, 13 y 19) son ejemplos de péptidos aptos para translocación en membrana aislados por el procedimiento descrito. El marcado puede ser visto por la fluorescencia en las células como se observa por microscopio (fotos izquierda y central) y la intensidad de fluorescencia de las células por FACS (carta de estructura). La carta de estructura de análisis FACS muestra fluorescencia-FITC (eje-x) contra las cuentas de células (eje-y). El péptido 24 es un péptido epítipo FLAG de control negativo, que no provoca que las células flouezcan como se analizó por microscopio o por FACS.

5 Como se describió *supra*, fueron llevadas a cabo selecciones paralelas o bien con DNaseI o con tripsina para evitar que la membrana enlazada o los complejos de péptidos-repA-ADN no translocados contaminen la recuperación de PTMs después de la lisis de las células. Los complejos de péptidos-repA-ADN internalizados serían resistentes al tratamiento con cualquiera de estas enzimas. En los procedimientos alternativos, o bien se usó DNaseI para digerir el ADN repA de tal forma que no pudiera ser amplificado, o se usó tripsina para digerir la proteína de péptido-repA y cualesquiera interacciones potenciales de proteína a proteína. Se descubrió que ambos métodos son exitosos al permitir la selección de los PTMs deseados.

(iv) *Análisis de secuencia de PTM's*

10 Se seleccionó un péptido apto para translocación en membrana (PTM) para análisis secuencial para determinar si la secuencia de péptido apto para translocación tenía algunas similitudes secuenciales a motivos conocidos de translocación en membrana. El resultado se muestra en la Figura 2.

15 Como se muestra, el péptido seleccionado (denominado D4, fila superior, número de identificación secuencial: 1) mostró alguna homología secuencial (como se indica en la fila del medio) al motivo conocido, apto para translocación en membrana, de la proteína HIV-TAT (fila inferior).

Los resultados demuestran ulteriormente la eficacia del método de selección descrito para aislar compuestos que muestran una actividad de translocación de membrana celular.

20 Es interesante hacer ver, sin embargo, que otros PTMs aislados de acuerdo con los métodos descritos no mostraron homología secuencial a dominios translocadores conocidos. Esto permite la identificación de nuevas clases de PTMs.

Ejemplo 2

(i) *Construcción de una genoteca de expresión Cis para selección de PTMs*

25 El siguiente ejemplo describe la selección de PTMs aptos para cruzar o penetrar membranas lipídicas sintéticas. La construcción de genoteca y la transcripción y traducción *in Vitro* son llevadas a cabo como se describió en el Ejemplo 1 *supra*.

(ii) *Selección de péptidos aptos para translocación en membrana celular*

La transcripción y translación *in Vitro* fue llevada a cabo como se describió en el Ejemplo 1 *supra*.

30 Las emulsiones de compartimentos de aceite artificial se hacen por la adición lenta de 50 µl de PBS (en 10 µl alícuotas) a 0.5 ml de hielo frío 0.5 % *Triton X-100* y 4.5 % *Span 80* (sorbitano de trioleato) en aceite mineral ligero sobre hielo agitado a 1.600 revoluciones por minuto durante 5 minutos. La mezcla de emulsión es entonces centrifugada a 3000 grs. durante 5 minutos y la fase oleaginosa es eliminada para dejar la emulsión al fondo del tubo. La transcripción y translación *in Vitro* se añade entonces a la mezcla de emulsión en 1 ml PBS y se mezcla por cinco veces de inversión suave e incubación en hielo durante 30 minutos.

35 Se añadió entonces 2.5 µg de DNaseI con 2 mM CaCl₂ y 2 mM MgCl (concentración final) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Alternativamente a la adición de DNaseI, puede ser añadido 1 µg/ml de tripsina e incubado a 37° C durante 30 minutos.

40 La emulsión se lava cinco veces por la adición de 1 ml PBS y por el centrifugado a 3000 grs. durante 5 minutos, eliminando la solución de lavado cada vez. La emulsión es rota y lavada por la adición de 1 ml. de hexano, tratada con vórtices, centrifugada brevemente, y, entonces, se elimina la capa de hexano. Esta fase de lavado puede ser repetida una o dos veces y el hexano residual es eliminado por secado en un Speedvac (Farmingdale, Nueva York) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

45 El ADN puede ser recuperado por adición de 100 µl PB buffer (Qiagen) y el ADN puede ser preparado para la siguiente ronda de selección como se describió en el Ejemplo 1.

El proceso de selección se repite, por ejemplo, 5 veces antes de clonar el ADN en fagocito, tal como se describió en el ejemplo 1 *supra*.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isogenica Ltd., COOMBER, David FITZGERALD, Kevin McGREGOR, Duncan ULLMAN, Chris LEANDERSON, Tomas

<120> Péptidos aptos para translocación en membrana

<130> P14008WO/DJC

<150>GB0515115.4

<151> 2005-07-22

<160> 1

5 <170> versión 3.3 P

<210>1

<211>19

<212>PRT

<213>Artificial

10 <220>

<223> PTM – D4 seleccionado

<400> 1

Ile Lys Ser Ser His Gly Arg Arg Trp Ser Asn Lys Asp Arg Lys Tyr
1 5 10 15

Ser His Ser

DOCUMENTOS DE PATENTES CITADOS EN LA DESCRIPCIÓN

- 15 - Patente estadounidense US 5888762
- Patente estadounidense US 6015787
- Patente mundial WO 0127154
- Patente mundial WO 9949879
- Patente estadounidense US 2004197867
- 20 - Patente mundial WO 02088318
- Patente mundial WO 2004050871
- Patente mundial WO 0058488
- Patente mundial WO 2004081188
- Patente mundial WO 2005017188
- 25 - Patente mundial WO 2004022746
- Patente mundial WO 99058655
- Patente británica GB 0515115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para aislar un compuesto que muestra actividad de translocación en membrana a partir de una genoteca de exhibición de péptidos, comprendiendo dicha genoteca una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos exhibidos, y que comprende las etapas de:
- 10 a) Expresión de una pluralidad de construcciones de ácido nucleico, en la que cada construcción de ácido nucleico comprende una secuencia promotora enlazada en forma operativa a la secuencia de ácido nucleico, resultando dicha expresión de la pluralidad de construcciones de ácido nucleico en la formación de una pluralidad de complejos de péptido de ácido nucleico, comprendiendo cada complejo al menos un péptido exhibido asociado con la correspondiente construcción de ácido nucleico que codifica el péptido exhibido;
- 15 b) Exposición de la pluralidad de complejos de péptido de ácido nucleico a una población de compartimentos encapsulados en membrana, y permisión de que tenga lugar una reacción de translocación;
- c) Eliminación de cualesquiera complejos de péptido de ácido nucleico que permanecen sin asociar con los compartimentos encapsulados en membrana; y
- 20 d) Recuperación de cualesquiera complejos de péptido de ácido nucleico internalizado del interior de los compartimentos encapsulados en membrana, y caracterización del péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico como comprensivo de un péptido apto para translocación en membrana (PTM), en el que la genoteca de expresión de péptidos es una genoteca de expresión de péptidos *in vitro*.
- 25 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de compartimentos encapsulados en membrana es una población de uno o más tipos celulares.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde el uno o más tipos celulares comprenden una capa de células.
- 30 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, donde la etapa (d) se modifica para recuperar complejos de péptido de ácido nucleico que se trastocan por la capa de células.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 ó la reivindicación 4, en el que las células son células Caco-2.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de compartimentos encapsulados en membrana es una población de liposomas.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, comprendiendo ulteriormente una etapa posterior a la (c) de eliminar complejos de péptido de ácido nucleico enlazados a la superficie de los compartimentos encapsulados en membrana, pero que no han sido internalizados.
- 40 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la eliminación comprende la exposición de los compartimentos encapsulados en membrana a una proteasa, a una nucleasa o a una combinación de una proteasa y una nucleasa.
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en los complejos de ácido nucleico de péptido asociado no en membrana están separados de los compartimentos encapsulados en membrana por la centrifugación de los compartimentos por medio de una capa no acuosa.
- 50 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la capa no acuosa es aceite mineral.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la genoteca de exhibición de péptido *in vitro* es una genoteca de expresión de péptido *in vitro* CIS.

- 5
12. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, comprendiendo ulteriormente la fase de correlación del uno o más péptidos expresos aptos para translocación en membrana de la etapa (d) con las correspondientes construcciones de ácido nucleico, identificando en consecuencia secuencias de ácido nucleico para los compuestos de péptidos aptos para translocación en membrana.
- 10
13. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el PTM comprende una secuencia de amino ácido de:
- (i) entre 2 y 50 residuos de longitud;
- (ii) entre 2 y 25 residuos de longitud; o
- (iii) entre 2 y 20 residuos de longitud.
- 15
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo ulteriormente el aislamiento de un PTM.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, comprendiendo ulteriormente la formación de un derivado del PTM por la implementación de un experimento de maduración para mejorar una o más características del PTM.
- 20
16. El procedimiento de la reivindicación 14 ó de la reivindicación 15, comprendiendo ulteriormente la conjugación del PTM a un grupo no apto para translocación.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el grupo no apto para translocación conjugado es una molécula terapéutica.
- 25
18. El procedimiento de la reivindicación 16 ó de la reivindicación 17, en el que la conjugación se hace por medio de un enlace di – sulfuro o un enlace de péptido adherible en forma enzimática.
- 30
19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que la molécula terapéutica es una molécula si ARN, un ácido nucleico de péptido o un anticuerpo de fragmento de anticuerpo.
20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, comprendiendo ulteriormente la mezcla del PTM con una población de liposomas para formar una concentración de liposomas que comprende uno o más liposomas y uno o más PTM; incluyendo ulteriormente, de forma opcional, un dominio de anticuerpo.
- 35
21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, comprendiendo ulteriormente la formulación de una composición farmacéutica que comprende el PTM.
22. El procedimiento de la reivindicación 12, comprendiendo ulteriormente el aislamiento de la construcción de ácido nucleico y su inserción en un vector o construcción de expresión.

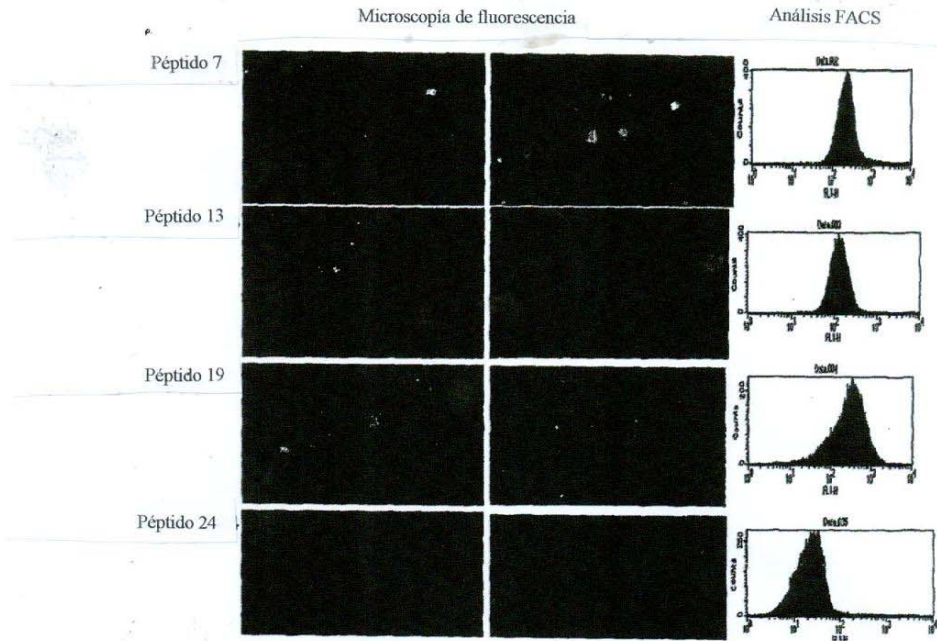


Figura 1

D4 : IKSSHGR-----RW----SNKDRKYSHS
SHGR R SNKD+
HIV-TAT : 46 LGISHGRKKRKHRRGTPQSNKDHQNPV

Figura 2