



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 621**

51 Int. Cl.:
C07K 14/79 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06806526 .7**
96 Fecha de presentación : **25.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1966240**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Péptidos de lactoferrina útiles como péptidos de penetración celular.**

30 Prioridad: **30.12.2005 EP 05028755**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

73 Titular/es: **EVONIK RÖHM GmbH**
Kirschenallee
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Brock, Roland;**
Fischer, Rainer;
Fotin-Mieczek Mariola;
Hufnagel Hansjörg y
Windhab, Norbert

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 361 621 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 de lactoferrina útiles como péptidos de penetración celular

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un péptido que es adecuado para usar como un péptido de penetración celular, a los complejos que lo comprenden y al uso de estos.
- 10 **[0002]** Los péptidos de penetración celular (CPP) como la penetratina derivada de antennapedia (Derossi et al., J. Biol. Chem., 269, 10444-10450, 1994) y el péptido Tat (Vives et al., J. Biol. Chem., 272, 16010-16017, 1997) son herramientas ampliamente utilizadas para la administración de moléculas cargadoras como péptidos, proteínas y oligonucleótidos (Fischer et al., Bioconjug. Chem., 12, 825-841, 2001) a las células. Las áreas de aplicación varían desde la investigación puramente biológica celular a la investigación biomédica (Dietz y Bähr, Mol. Cell., Neurosci, 27, 85 -131, 2004). Inicialmente, se creía que la absorción celular ocurría por penetración directa de la membrana plasmática (Prochiantz, Curr. Opin. Cell Biol., 12, 400-406, 2000). En los últimos años, se acumularon pruebas de que para varios CPP la endocitosis contribuye al menos significativamente a la absorción celular para varios CPP (por una revisión, consulte Fotin-Mleczek et al., Curr. Pharm. Design, 11, 3613-3628, 2005). Dados estos resultados recientes, la especificación de un péptido como un CPP no implica por lo tanto un mecanismo de importación celular específico, sino que se refiere más bien a una función como péptido que, cuando se conjuga con una molécula cargadora, ya sea covalentemente o no covalentemente, mejora la absorción celular de la molécula cargadoras.
- 15 **[0003]** WO 00/04132 A describe la producción de masa del polipéptido lactoferrina a partir de levadura y microorganismos útiles.
- 20 **[0004]** Moriarty et al., FEMS Microbiol.Letters (2004) 239, 2, 295-299, XP004597837, se relaciona con factores que contribuyen a la potencia de péptidos catiónicos de la región N-terminal de la lactoferrina humana.
- 25 **[0005]** Aguilera et al., FEBS Letters (1999) 462, 3, 273-277, XP004260630 describe la acción de permeabilización de un péptido derivado de lactoferrina en las membranas bacterianas y artificiales.
- 30 **[0006]** WO 00/01730 A describe péptidos basados en la secuencia de la lactoferrina humana y sus usos.
- [0007]** Vogel et al., Biochimie et Biologie Cellulaire, XX, XX, 80, 1, 49-63, XP008059255, describe un análisis dirigido a estructura-función de la lactoferrina bovina y péptidos relacionados que contienen arginina y triptofano.
- 35 **[0008]** Shibli et al. (2002), Biochem. Cell. Biol, 80, p. 667 - 677) describe péptidos antimicrobianos ricos en triptofano, propiedades comparativas e interacciones de membrana.
- [0009]** He y Furmanski (1995), Nature, 373, p. 721 - 724) describe la unión de la lactoferrina al ADN.
- 40 **[0010]** Derossi et al. (1998), Trends Cell. Biol., 8, p. 84 - 87) tratan "Péptidos troyanos: el sistema de la penetratina para la administración intracelular".
- [0011]** Aunque esos CPP han demostrado ser en principio adecuados para la administración de péptidos, proteínas y oligonucleótidos a las células, todavía es necesario proporcionar otros CPP que permitan la administración de dichas moléculas como moléculas cargadoras. En particular, existe la necesidad de CPP que (i) permitan una rápida liberación de la molécula cargadora desde la vía endolisosómica y (ii) eviten reacciones inmunológicas en el momento de la aplicación a un ser humano.
- 45 **[0012]** El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante las características de las reivindicaciones de la presente.
- 50 **[0013]** En una realización del primer aspecto el péptido comprende al menos cuatro aminoácidos catiónicos.
- [0014]** En una realización del primer aspecto el péptido comprende al menos dos residuos Cys o análogos de esta.
- 55 **[0015]** En una realización preferida del primer aspecto el péptido comprende un enlace disulfuro creado por dos residuos Cys o un enlace análogo formado por análogos de la cisteína.
- [0016]** En una realización del primer aspecto el péptido comprende una porción que tiene conformación de hélice alfa de aproximadamente 12 a 20 aminoácidos de longitud, y una porción que tiene una conformación de hoja beta de aproximadamente 8 a 12 aminoácidos de longitud.
- 60 **[0017]** En una realización del primer aspecto el péptido tiene una secuencia de aminoácidos, donde el extremo N-terminal del péptido es un aminoácido que corresponde a los aminoácidos de las posiciones 20 a 64 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 1 o SEC. ID N°: 2.
- 65

- [0018]** En una realización del primer aspecto el péptido se selecciona del grupo que comprende
- [0019]** un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos KCFWQRNMRKVRGPPVSCIQR (SEC. ID N°: 3),
 5 un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos
 CFWQRNMRKVRGPPVSC (SEC. ID N°: 4),
 un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos KCRRWQWRMCKLKGAPSITCVRR (SEC. ID N°: 29), y
 un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos
 10 CRRWQWRMCKLKGAPSITC (SEC. ID N°: 30)
 y sus derivados.
- [0020]** En una realización preferida de la presente invención los péptidos de penetración celular comprenden una
 secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 3, SEC. ID N°: 4, SEC. ID N°: 29 o SEC. ID N°: 30.
- [0021]** Los péptidos preferidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 3, SEC. ID
 15 N°: 4, SEC. ID N°: 29 o SEC. ID N°: 30 poseen una carga catiónica, en particular de al menos cuatro aminoácidos
 catiónicos ubicados en SEC. ID N°: 3, SEC. ID N°: 4, SEC. ID N°: 29 o SEC. ID N°: 30. Otra característica preferida de
 dichos péptidos es la presencia de al menos dos cisteínas o análogos de la cisteína que pueden formar un puente
 20 disulfuro o un puente análogo. Ambas cisteínas o sus análogos encierran menos de 6 aminoácidos.
- [0022]** En una realización preferida del primer aspecto el péptido es un derivado de los péptidos de acuerdo con SEC.
 ID N°: 3 o 4, donde el residuo de metionina es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que comprende
 valina, isoleucina, norvalina, leucina y norleucina.
- [0023]** En una realización más preferida del primer aspecto el péptido es un péptido que tiene una secuencia de
 25 aminoácidos seleccionada del grupo que comprende
- KCFWQRNVRKVRGPPVSCIQR (SEC. ID N°: 7)
 KCFWQRNIRKVRGPPVSCIQR (SEC. ID N°: 8)
 30 KCFWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEC. ID N°: 9), donde X es norvalina,
 KCFWQRNLRKVRGPPVSCIQR (SEC. ID N°: 10),
 KCFWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEC. ID N°: 28), donde X es norleucina,
 CFWQRNVRKVRGPPVSC (SEC. ID N°: 11),
 CFWQRNIRKVRGPPVSC (SEC. ID N°: 12),
 35 CFWQRNXRKVRGPPVSC (SEC. ID N°: 13), donde X es norvalina,
 CFWQRNLRKVRGPPVSC (SEC. ID N°: 14),
 CFWQRNXRKVRGPPVSC (SEC. ID N°: 15), donde X es norleucina,
- [0024]** En una realización del primer aspecto los derivados tienen un grupo de unión seleccionado preferentemente del
 40 grupo que comprende tioéteres, donde el grupo de unión reemplaza al enlace disulfuro formado por esos residuos de
 Cys.
- [0025]** En una realización del primer aspecto, el péptido está marcado radiactivamente, preferentemente por haber
 incorporado un aminoácido marcado radiactivamente, donde más preferentemente el aminoácido marcado
 45 radiactivamente es un aminoácido marcado con tritio.
- [0026]** En una realización del primer aspecto el péptido comprende además una porción que es adecuada para
 detección usando un método para detección, donde dicha porción se selecciona preferentemente del grupo que
 comprende fluoróforos, trazadores radiactivos y haptenos, donde preferentemente el hapteno es biotina.
- [0027]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un segundo aspecto mediante un
 50 complejo que comprende un péptido seleccionado del grupo que comprende un péptido de acuerdo con el primer
 aspecto y una molécula cargadora.
- [0028]** En una realización del segundo aspecto la molécula cargadora está unida al péptido covalentemente o no
 55 covalentemente.
- [0029]** En una realización del segundo aspecto la molécula cargadora se selecciona del grupo que comprende ácidos
 nucleicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas, y mezclas de cualquiera de
 ellos.
- [0030]** En una realización del segundo aspecto la molécula cargadora está presente como una estructura o parte de una
 60 estructura, donde la estructura se selecciona del grupo que comprende nanopartículas, micropartículas, liposomas y
 micelas.

- [0031]** En una realización preferida del segundo aspecto el ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende moléculas de ADN, moléculas de ARN, moléculas de ANP, moléculas de ARNsi, moléculas antisentido, ribozimas, aptómeros, spiegelmers y moléculas señuelo.
- 5 **[0032]** En una realización alternativa preferida del segundo aspecto el péptido se selecciona el grupo que comprende péptidos para vacunación.
- [0033]** En otra realización alternativa preferida del segundo aspecto el ácido nucleico es una vacuna a base de ácido nucleico.
- 10 **[0034]** Aún en otra realización preferida alternativa del segundo aspecto las nanopartículas y/o las micropartículas comprenden un compuesto farmacéuticamente activo o consisten en él.
- [0035]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un tercer aspecto mediante una composición que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que comprende un péptido de acuerdo con el primer aspecto, lactoferrina humana y lactoferrina bovina, y una molécula cargadora.
- 15 **[0036]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un cuarto aspecto mediante una composición que comprende un complejo de acuerdo con el segundo aspecto.
- 20 **[0037]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un quinto aspecto mediante un ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con el primer aspecto, que tiene preferentemente una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEC. ID N°: 26.
- 25 **[0038]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un sexto aspecto mediante una composición que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el quinto aspecto y una molécula cargadora.
- [0039]** En una realización preferida del sexto aspecto la molécula cargadora es un ácido nucleico y más particularmente un ARN adecuado para vacunación.
- 30 **[0040]** En una realización preferida del sexto aspecto la molécula cargadora es un ácido nucleico que codifica un péptido.
- [0041]** En una realización preferida del sexto aspecto el ácido nucleico de acuerdo con el quinto aspecto está unido operativamente al ácido nucleico que codifica un péptido.
- 35 **[0042]** En una realización más preferida del sexto aspecto el ácido nucleico de acuerdo con el quinto aspecto y el ácido nucleico que codifica un péptido están unidos en el marco.
- 40 **[0043]** En una realización del sexto aspecto el péptido es un principio farmacéuticamente activo.
- [0044]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un séptimo aspecto mediante el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto como un péptido de penetración celular.
- 45 **[0045]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un octavo aspecto mediante el uso de lactoferrina humana o uno de sus derivados funcionales o de lactoferrina bovina o uno de sus derivados funcionales como un péptido de penetración celular.
- [0046]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un noveno aspecto mediante el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto como un agente de transfección.
- 50 **[0047]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un undécimo aspecto mediante el uso de una composición de acuerdo con el tercer, el cuarto y el sexto aspectos para la fabricación de un medicamento.
- 55 **[0048]** En una realización del undécimo aspecto la molécula cargadora es un principio farmacéuticamente activo.
- [0049]** El problema subyacente a la presente invención también se resuelve en un duodécimo aspecto mediante el uso de una composición de acuerdo con el tercer, el cuarto y el sexto aspectos para la fabricación de un agente de diagnóstico.
- 60 **[0050]** En una realización del duodécimo aspecto la molécula cargadora es un marcador para diagnóstico.
- [0051]** Los inventores de la presente encontraron sorprendentemente, que los péptidos a los que en este documento se hace referencia como péptidos de acuerdo con la presente invención, son adecuados para actuar como péptidos de penetración celular (CPP) y pueden por consiguiente administrar moléculas cargadoras al citoplasma de una célula. Un
- 65

5 CPP es preferentemente cualquier péptido o proteína adecuado para penetrar una membrana celular, más preferentemente la membrana plasmática de una célula mamífera. Sin embargo, se debe comprender que preferentemente la expresión CPP no implica un mecanismo de importación celular específico. Más específicamente, los inventores de la presente se dieron cuenta de que péptidos específicos derivados de la lactoferrina humana se liberan desde los compartimientos endolisosómicos de manera muy eficaz lo cual a su vez va acompañado de una liberación muy eficaz de cualquier molécula o moléculas cargadoras. Una vez que las moléculas cargadoras están disponibles en el citoplasma pueden ejercer cualquier efecto asociado con ellas. A tal grado que, los polipéptidos de acuerdo con la invención proveen un medio eficaz para influenciar los mecanismos y rutas biológicos de una célula los cuales se pueden usar tanto para investigación como para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Según se usa en este documento y si no se indica lo contrario, la expresión péptidos de acuerdo con la presente invención comprende también preferentemente las lactoferrinas humana y bovina según se definieron preferentemente en este documento.

15 **[0052]** Los péptidos de acuerdo con la presente invención son, en principio, fragmentos de la lactoferrina humana o bovina, o uno de sus derivados. Debido a este origen, los péptidos de acuerdo con la presente invención tienen, aparte de ser adecuados para administrar moléculas cargadoras al citoplasma, un perfil inmunológico beneficioso en la medida en que los péptidos respectivos no provocarán una respuesta inmunitaria en un huésped humano o bovino expuesto a los respectivos péptidos de acuerdo con la presente invención.

20 **[0053]** La lactoferrina humana (hLF) es una glucoproteína unida al hierro de 77 kDa de 692 aminoácidos que constituye el 15% de la cantidad de proteína contenida en la leche materna humana y también se puede encontrar en bajas concentraciones en el plasma sanguíneo (Nemet y Simonovits, Haematologia (Budap.) 18, 3-121985). La homóloga bovina (bLF) consta de 688 aminoácidos y comparte 68% de identidad aminoacídica con hLF (Crichton, Adv. Protein Chem. 40, 281-363, 1990). No obstante, solo 0.5-1% de la proteína de leche bovina es bLF. Se ha informado de propiedades antimicrobianas (Orsi, Biometals 17, 189-196, 2004; Ward y Conneely, Biometals 17, 203-208, 2004), antifúngicas, de unión a LPS (Vogel et al., Biochem. Cell Biol. 80, 49-63, 2002) y antivirales (Berkhout et al., Biometals 17, 291-294, 2004) así como de varias actividades enzimáticas como actividad de DNasa, RNasa, ATPasa y fosfatasa (Kanyshkova et al., Eur. J. Biochem. 270, 3353-3361, 2003) para ambas proteínas. Las proteínas lactoferrina (LF) también actúan como factores de transcripción (He y Furmanski, Nature 373, 721-724, 1995) y tienen un impacto sobre la regulación inmunitaria por inducción de la secreción de interleucinas (Sorimachi et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 43, 79-87, 1997; Vogel et al., 2002).

35 **[0054]** Los péptidos de acuerdo con la presente invención son preferentemente fragmentos de la región N-terminal de la lactoferrina humana o bovina. Otras características estructurales que individualmente o en cualquier combinación se pueden lograr con los péptidos de acuerdo con la presente invención se dan a conocer más adelante

[0055] Preferentemente, dicho fragmento y por lo tanto un péptido de acuerdo con la presente invención contiene al menos cuatro residuos de aminoácidos catiónicos. Más preferentemente, esos fragmentos son catiónicos, es decir, tienen una carga global positiva a los valores del pH fisiológico.

40 **[0056]** Los péptidos de acuerdo con la presente invención pueden compartir una combinación de estructuras secundarias como una hélice alfa o una hoja beta. En particular dicha hélice y dicha hoja forman porciones individuales de los péptidos. Muy preferentemente, los péptidos comprenden una estructura hélice-giro-hoja. La longitud de dichas porciones varía típicamente de 12 a 20 aminoácidos y de 8 a 12 aminoácidos de longitud para las porciones con conformación de hélice alfa y hoja beta, respectivamente.

45 **[0057]** Otra característica inherente a las realizaciones preferidas de los péptidos de acuerdo con la presente invención es la presencia de al menos dos residuos de Cys. Dichos residuos de Cys están separados uno de otro por una cantidad de aminoácidos intermitentes. Preferentemente la cantidad de dichos aminoácidos intermitentes varía de 8 a 20 aminoácidos, más preferentemente de 14 a 18 y es muy preferentemente 16. Aún en otra realización los dos residuos de Cys están ubicados en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal del péptido de acuerdo con la presente invención. Está previsto en la presente invención que los residuos de Cys respectivos, individualmente o en combinación, estén ubicados en los extremos del péptido o próximos a ellos, es decir, formen los extremos N-terminal y C-terminal del péptido. Alternativamente, uno o ambos de dichos extremos Cys no forman los respectivos extremos del péptido, pero el péptido comprende otros aminoácidos secuencia arriba del residuo de Cys respectivo en el caso del extremo N-terminal, o secuencia abajo del residuo de Cys respectivo en el caso del extremo C-terminal. En una realización aún más preferida los dos residuos de Cys forman un enlace disulfuro intramolecular, donde dicho enlace disulfuro existe preferentemente bajo las condiciones existentes cuando se aplican o usan los péptidos de acuerdo con la presente invención como CPP. Los expertos saben cómo generar dichos enlaces disulfuro en el momento o durante la síntesis del péptido respectivo. En una realización alternativa, los dos residuos de Cys forman un enlace disulfuro intermolecular.

60 **[0058]** Aún en otra realización el enlace disulfuro, si lo hubiera, es reemplazado por una porción que reemplaza estructural y funcionalmente al enlace disulfuro, sin embargo, no está sujeta a escisión reductiva. Dicha porción es ejemplificada, pero no exclusivamente, por un grupo metileno (JACS, 1985, 107, 2986-2987, Bioorg. Med. Chem. Letter 1999, 9, 1767-1772, J. Med. Chem, 2002, 45, 1767-1777), un puente tioéter (Yu et al. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 6633-

6636), un puente carbonilo (Pawlak et al. J. Pept. Sci. 2001, 7, 128- 140), y una cadena alifática más larga (Tetrahedron Lett. 2001, 42, 5804-5804), donde cada una de dichas porciones reemplaza al enlace disulfuro. Dependiendo del protocolo específico y la porción usada para conectar los dos residuos de aminoácidos, puede ser necesario el reemplazo de los residuos de cisteína por otros bloques de construcción, p. ej. homoserina (Yu et al. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 6633-6636), como reconocerán los expertos. Preferentemente la longitud de la cadena alifática más larga es entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 átomos de C, donde este intervalo comprende cualquier longitud intermedia que sea un número entero.

[0059] En otra realización preferida los péptidos de acuerdo con la presente invención son fragmentos de la lactoferrina humana o bovina. Preferentemente la lactoferrina humana tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 1, y la lactoferrina bovina la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 2. Más preferentemente, los péptidos de acuerdo con la presente invención corresponden en su secuencia aminoacídica a una secuencia de aminoácidos comprendida o definida por las posiciones 20 a 64 de la secuencia de acuerdo con SEC. ID N°: 1 o de la secuencia de acuerdo con SEC. ID N°: 2. Sin embargo, también está previsto en la presente invención que solo parte de los péptidos de acuerdo con la presente invención esté ubicada dentro del intervalo definido antes de la secuencia de aminoácidos de la lactoferrina humana o bovina.

[0060] En una realización más preferida, los péptidos de acuerdo con la presente invención se derivan de la lactoferrina humana o bovina como se especifica en los párrafos previos y comparten una o varias, preferentemente todas las otras características dadas a conocer en este documento.

[0061] En otra realización los péptidos de acuerdo con la presente invención son derivados de cualquiera de los péptidos de acuerdo con la presente invención descritos en este documento y en particular como los dados a conocer en los párrafos previos. Los expertos reconocerán que se pueden hacer cambios en la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos sin que dichos péptidos pierdan las características que los hacen funcionales como CPP. Preferentemente esos cambios se hacen en la secuencia de aminoácidos. Más preferentemente dicho cambio comprende el reemplazo de un aminoácido de una categoría distinta por otro aminoácido de la misma categoría. Dichas categorías son preferentemente aminoácidos neutros, aminoácidos hidrófobos (en particular incluidos los aminoácidos alifáticos), aminoácidos catiónicos, aminoácidos aniónicos, aminoácidos que contienen tiol, aminoácidos aromáticos y aminoácidos heterocíclicos. Los aminoácidos hidrófobos (incluidos los aminoácidos alifáticos) se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, los aminoácidos aromáticos se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina y triptofano, los aminoácidos iónicos se seleccionan preferentemente del grupo de aminoácidos catiónicos como lisina, arginina, histidina y los aminoácidos aniónicos como aspartato y glutamato, Los aminoácidos neutros se seleccionan preferentemente del grupo serina, treonina, asparragina, glutamina y metionina, los aminoácidos que contienen tiol son preferentemente cisteína y metionina y los aminoácidos heterocíclicos son preferentemente prolina e histidina. Especialmente el residuo de metionina en la posición 46 se puede intercambiar con un residuo alifático como, por ejemplo, pero no exclusivamente, valina, norvalina, leucina o norvalina. Como los péptidos se pueden obtener siguiendo protocolos de síntesis orgánica, los reemplazos de aminoácidos no están limitados a los de los aminoácidos proteinogénicos. Cualquier bloque de construcción, incluidos pero no exclusivamente los aminoácidos no proteinogénicos y los beta-aminoácidos, que pueda ser incorporado mediante procedimientos químicos adecuados se puede incluir en el péptido.

[0062] Los péptidos particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención son los que tienen una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 3 y de acuerdo con SEC. ID N°: 4, y sus respectivos derivados.

[0063] Está previsto en la presente invención que si un péptido de acuerdo con la presente invención es la lactoferrina humana u bovina, dicho péptido, en una realización referida, también comprenda fragmentos de la proteína lactoferrina humana o bovina completa. Dichos fragmentos son preferentemente fragmentos funcionalmente activos. Según se usa en este documento un fragmento funcionalmente activo de la lactoferrina humana o bovina es o comprende una parte de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 1 o SEC. ID N°: 2 con la condición de que dicho fragmento siga manteniendo actividad de CPP, preferentemente una actividad de CPP como la definida en este documento. Preferentemente la actividad de dicho péptido como un CPP, o la actividad de CPP, se puede determinar mediante conjugación del péptido respectivo a un fluorocromo o hapteno que en este caso sirve como un grupo reportero y como una molécula cargadora y permite la detección y cuantificación de la absorción celular por métodos conocidos por los expertos en el área. Dichos métodos incluyen, pero no exclusivamente, (i) citometría de flujo y microscopía fluorescente para los fluoróforos que sirven como grupo reportero o (ii) fijación y permeabilización de células seguidas de incubación con un reactivo adecuado para la detección, para haptenos que sirven como grupo reportero. Alternativamente, el CPP se puede marcar radiactivamente, por ejemplo por incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente y la absorción celular se puede determinar por radiografía. El último método permite la determinación de la absorción y la distribución, para los péptidos solos sin ninguna molécula cargadora. Se entiende que en la medida en que el método lo permita, la absorción y distribución también se pueden determinar y cuantificar para los tejidos y los organismos enteros. Alternativamente, la absorción se puede determinar indirectamente por medio de la actividad biológica de una molécula cargadora conjugada al CPP y con la molécula cargadora ejerciendo su actividad biológica solo si la molécula ingresa en la célula y alcanza una localización subcelular particular como el citoplasma o el núcleo.

5 [0064] En otra realización los péptidos de acuerdo con la presente invención comprenden además una porción que es adecuada para la detección. Más específicamente, dicha porción prevé la detección del péptido. La porción puede ser cualquier grupo adecuado para ese propósito. Las porciones respectivas son conocidas por los expertos en el área y comprenden, aunque, no exclusivamente, los fluoróforos, como por ejemplo carboxifluoresceína o biotina. Preferentemente la detección se produce por medio de fluorescencia. Alternativamente, la detección también puede ocurrir por medio de radiactividad, por ejemplo después de la incorporación de ¹²⁵Yodo según protocolos conocidos por los expertos. La detección también puede producirse a nivel de una célula individual, un tejido, un órgano o un animal. Preferentemente el animal es un mamífero y más preferentemente seleccionado del grupo que comprende un perro, un gato, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, una vaca, un caballo y un ser humano.

10 [0065] En otro aspecto de la presente invención los péptidos de acuerdo con la presente invención forman un complejo junto con una molécula cargadora. Dicha molécula cargadora puede ser cualquier molécula cargadora como las definidas en este documento. El complejo puede ser cualquier complejo covalente o no covalente que comprenda al menos un péptido de acuerdo con la presente invención y al menos una molécula cargadora. También está previsto en la presente invención que el complejo comprenda más de un péptido de acuerdo con la presente invención, es decir una pluralidad de esos péptidos, donde la pluralidad de los péptidos puede comprender una pluralidad de los mismos péptidos o de péptidos diferentes. Asimismo, el complejo de acuerdo con la presente invención también puede comprender más de una molécula cargadora, donde la pluralidad de las moléculas cargadoras puede comprender una pluralidad de las mismas moléculas cargadoras o de diferentes moléculas cargadoras.

20 [0066] En una realización, el complejo entre el o los péptidos de acuerdo con la presente invención y la o las moléculas cargadoras se forma mediante enlaces covalentes. Dichos enlaces covalentes se forman preferentemente entre cualquier grupo reactivo adecuado del péptido y la molécula cargadora y más preferentemente entre un extremo del péptido de acuerdo con la presente invención y la o las moléculas cargadoras. Dependiendo de la naturaleza química, las moléculas cargadoras, la porción, el grupo o el radical con el cual se forma dicho enlace covalente varía, y forma parte de las aptitudes de un experto crear dicho enlace. En una realización, el enlace covalente puede ser un enlace amida formado entre el grupo carboxi del aminoácido C-terminal de un péptido de acuerdo con la presente invención y el grupo alfa amino del aminoácido N-terminal de un péptido que constituye una molécula cargadora. Alternativamente, el complejo se puede formar basado en uno o más enlaces no covalentes. Dichos enlaces no covalentes pueden ser enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno o interacciones hidrófobas o una combinación de dichos enlaces. En una realización dichos enlaces no covalentes se pueden formar mediante un tramo de residuos de lisina, unidos mediante enlaces covalentes a un péptido de acuerdo con la presente invención y el esqueleto de fosfato de un oligonucleótido. Preferentemente el tramo de lisina consta aproximadamente de 5 a 15 residuos de lisina.

35 [0067] Las moléculas cargadoras no están, en principio, limitadas con respecto al tamaño, la naturaleza química ni la función. De conformidad con eso la molécula cargadora se puede seleccionar del grupo que comprende ácidos nucleicos, péptidos, moléculas, lípidos, carbohidratos, nanopartículas y micropartículas y sus combinaciones. En una realización preferida, las moléculas cargadoras están dentro de los límites establecidos por las aplicaciones en biología celular o las aplicaciones terapéuticas.

40 [0068] En una realización el ácido nucleico es cualquier polímero que consta de al menos dos nucleótidos que estén unidos covalentemente. En una realización un ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o una molécula de ARN o una mezcla de estos. También está previsto en la presente invención que el ácido nucleico conste de L-nucleótidos, D-nucleótidos o sus mezclas. En otra realización, la porción base, la porción azúcar y/o la porción fosfato del nucleótido individual se pueden modificar individualmente e independientemente para cada uno y para cualquiera de los nucleótidos que forman el ácido nucleico o el análogo respectivo. Las porciones azúcar modificadas particularmente preferidas son las que tienen un grupo metilo, metoxi, etilo o etoxi en el átomo 2' de la porción azúcar. Las porciones fosfato modificadas particularmente preferidas son los fosfotioatos. En otra realización preferida, se emplean ácidos nucleicos peptídicos.

50 [0069] En otra realización preferida la molécula cargadora es un aminoácido, que procede del grupo de los L- o D-aminoácidos. El aminoácido puede ser cualquier aminoácido, ya sea de origen natural o no natural.

55 [0070] En otra realización preferida la molécula cargadora es un péptido, que consta de al menos dos aminoácidos que están unidos covalentemente, preferentemente a través de un enlace peptídico. En una realización el péptido consiste en L-aminoácidos, D-aminoácidos o sus mezclas. Los aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido, ya sea de origen natural o no natural. En una realización preferida el término péptido comprende también por lo tanto péptidos y proteínas como se entienden generalmente en el área. Los péptidos o las proteínas se pueden purificar de fuentes naturales, obtener a través de síntesis orgánica u obtener por conjugación de aminoácidos o péptidos sintéticos con péptidos o proteínas obtenidos de fuentes naturales siguiendo protocolos conocidos por los expertos en el área y ejemplificados, pero no exclusivamente, por la unión química natural. Preferentemente, los péptidos tendrán una longitud de 2 a 40 aminoácidos, más preferentemente de 2 a 20 aminoácidos y muy preferentemente de 4 a 15 aminoácidos. Según se usa en este documento, el término proteína se refiere preferentemente a un polipéptido que contiene una estructura secundaria y más preferentemente una estructura terciaria.

[0071] En otra realización preferida la molécula cargadora es una molécula pequeña, donde la molécula pequeña es preferentemente una molécula que tiene un peso molecular de 1000 D o menos y más preferentemente representa un fármaco o un candidato a fármaco. Una clase particularmente preferida de moléculas pequeñas son las moléculas heterocíclicas pequeñas.

[0072] En otra realización preferida la molécula cargadora es un lípido o una subestructura de un lípido como una porción de éste. Preferentemente, una molécula de este tipo ejercerá una función particular una vez que actúe sobre la célula ya sea en el interior o en la membrana plasmática. Un ejemplo de lo anterior es diacilglicerol. Este ejemplo ilustra que un lípido que ejerce dicha función particular se selecciona preferentemente del grupo que comprende mensajeros intracelulares. Un ejemplo del último y que por lo tanto representa una posible molécula cargadora es un lipopéptido, preferentemente un lipopéptido con una porción S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteinil-(S)-seril-tetra-(S)-lisina y muy preferentemente un péptido con una S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteinil-(S)-seril-tetra-(S)-lisina que actúa como un agonista o antagonista de un receptor de tipo Toll.

[0073] En otra realización preferida la molécula cargadora es un carbohidrato.

[0074] En otra realización preferida la molécula cargadora es un agente de contraste utilizado en imagenología de resonancia magnética. Dichos agentes de contraste son por ejemplo, pero no exclusivamente gadolinio (III)-DTPA (ácido dietilenotriaminapentaacético) o gadolinio (III)-DOTA (1,4,7,10-ácido tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético)

[0075] En otra realización preferida, la molécula cargadora es una partícula. Una partícula puede ser una partícula de un polímero, que consista, por ejemplo, en poliestireno reticulado, N-(2-hidroxipropil)metacrilamida reticulada, dextrano reticulado, un liposoma o una micela. Preferentemente, la partícula sirve como un portador o contenedor de una molécula funcional. La molécula funcional puede ser cualquier molécula que ejerza una función dentro de las células, por ejemplo, quimioterápicos y oligonucleótidos y preferentemente los que también pueden servir como moléculas cargadoras para los péptidos de acuerdo con la presente invención. En general el acoplamiento de la molécula funcional a la partícula, respectivamente la carga de las moléculas funcionales en la partícula, intenta mejorar las propiedades farmacocinéticas de la molécula funcional, por ejemplo prolongando su circulación en el organismo mientras el acoplamiento del péptido o péptidos de acuerdo con la presente invención hace de mediador en la administración de esas moléculas funcionales a las células. Además del péptido o péptidos de acuerdo con la presente invención, las partículas pueden ser modificadas aún más mediante una porción o una molécula que medie la focalización de las partículas en células específicas. Un ejemplo de dicha focalización son los anticuerpos dirigidos contra proteínas enriquecidas en la superficie de células cancerosas. En una realización la partícula puede tener un núcleo ferromagnético. Tales partículas se pueden usar en aplicaciones como hipertermia magnética de fluidos (Jordan et al., Int J Hyperthermia, 12, 705-722, 1996)

[0076] En otra realización preferida la molécula cargadora es un punto cuántico. El acoplamiento del péptido o péptidos de acuerdo con la presente invención al punto cuántico se puede obtener mediante acoplamiento covalente, por ejemplo mediante formación de un enlace amida entre funcionalidades adecuadas del péptido y el punto cuántico o mediante interacciones no covalentes, por ejemplo entre una porción biotina y una molécula de estreptavidina acoplada al punto cuántico. En un ejemplo un péptido de penetración celular se unió covalentemente a un punto cuántico mediante elongación del péptido de penetración celular con un residuo de cisteína y acoplamiento a puntos cuánticos con funciones amino usando un grupo de unión heterobifuncional (S. Santra et al., ChemComm, 2005, 3144-3146).

[0077] En otra realización, las moléculas cargadoras se pueden definir en términos funcionales.

[0078] En una realización particular la molécula cargadora es una molécula de ARNsi.

[0079] Las moléculas de ARNsi son ARN interferentes pequeños dirigidos a un ácido nucleico blanco, preferentemente ARNm, que codifica la molécula blanco ARNsi es un ARN bicatenario que tiene típicamente una longitud entre aproximadamente 21 y aproximadamente 23 nucleótidos. La secuencia de una de las dos hebras del ARN corresponde a la secuencia del ácido nucleico blanco que se va a degradar. En otras palabras, conociendo la secuencia del ácido nucleico de la molécula blanco, preferentemente la secuencia del ARNm, se puede diseñar un ARN bicatenario de modo que una de las dos hebras sea complementaria de dicho ARNm de la molécula blanco y, en el momento de la aplicación de dicho ARNsi a un sistema que contiene el gen, ADN genómico, ARNhh o ARNm que codifica la molécula blanco, el ácido nucleico blanco correspondiente respectivo se degradará y por lo tanto el nivel de la proteína respectiva se reducirá. Los principios básicos de diseño, construcción y uso de dicho ARNip como medicamento y agente de diagnóstico, respectivamente, se describen, entre otros, en las solicitudes de patente internacional WO 00/44895 y WO 01/75164.

[0080] En una realización particular la molécula cargadora es una ribozima.

[0081] Las ribozimas son ácidos nucleicos catalíticamente activos que consisten preferentemente en ARN que comprende básicamente dos porciones. La primera porción muestra una actividad catalítica en tanto la segunda porción es responsable de la interacción específica con el ácido nucleico blanco. En el momento de la interacción entre el ácido

nucleico blanco y la segunda porción de la ribozima, típicamente por hibridación y apareamiento de bases de Watson-Crick de tramos de bases esencialmente complementarios en las dos hebras hibridantes, la porción catalíticamente activa puede tornarse activa lo que significa que cataliza, ya sea intramolecularmente o intermolecularmente, al ácido nucleico blanco en caso de que la actividad catalítica de la ribozima sea una actividad de fosfodiesterasa. A continuación, puede haber otra degradación del ácido nucleico blanco que al final resulte en la degradación del ácido nucleico blanco así como de la proteína derivada de dicho ácido nucleico blanco debido a la falta de proteína recién sintetizada correspondiente al ácido nucleico blanco y a una renovación de la respectiva proteína existente previamente. La ribozimas, su uso y principios de diseño son conocidos por los expertos en el área y se describen, por ejemplo, en Doherty y Doudna (Ribozym structures and mechanism. Annu ref Biophys. Biomolstruct. 2001 ; 30 :457-75) y en Lewin y Hauswirth (Ribozyme Gene Therapy: Applications for molecular medicine. E001 7: 221-8).

[0082] En una realización particular la molécula cargadora es una molécula antisentido.

[0083] El uso de oligonucleótidos antisentido para la fabricación de un medicamento y como agentes de diagnóstico, respectivamente, se basa en un modo similar de acción al de las moléculas de ARNs i y las ribozimas. Básicamente, los oligonucleótidos antisentido se hibridan basándose en la complementariedad de bases, con un ARN blanco, preferentemente con un ARNm, activando por lo tanto la RNasa H. La RNasa H es activada tanto por el ADN acoplado a fosfodiéster como a fósforotioato. El ADN acoplado a fosfodiéster, sin embargo, es degradado rápidamente por nucleasas celulares con excepción del ADN acoplado a fósforotioato. Estos derivados de ADN resistentes y que no son naturales, no inhiben a la RNasa H al hibridarse con el ARN. En otras palabras, los polinucleótidos antisentido solo son eficaces como complejos híbridos ADN ARN. Ejemplos de este tipo de oligonucleótidos antisentido se describen, entre otros, en las patentes de los Estados Unidos US 5,849,902 y US 5,989,912. En otras palabras, basándose en la secuencia del ácido nucleico de la molécula blanco respectiva, ya sea de la proteína blanco a partir de la cual se puede deducir en principio una secuencia de ácido nucleico respectiva, o conociendo la secuencia de ácido nucleico como tal, particularmente el ARNm, se pueden diseñar oligonucleótidos antisentido adecuados, basándose en el principio de la complementariedad de bases.

[0084] Son particularmente preferidos los oligonucleótidos antisentido que tienen un corto tramo de ADN-fósforotioato (3 a 9 bases). Se necesita un mínimo de 3 bases de ADN para la activación de la RNasa H bacteriana y un mínimo de 5 bases para la activación de la RNasa H mamífera. En esos oligonucleótidos quiméricos hay una región central que forma un sustrato para la RNasa H que está flanqueada por "brazos" hibridantes compuestos por nucleótidos modificados que no forman sustrato para la RNasa H. Los brazos hibridantes de los oligonucleótidos quiméricos se pueden modificar mediante 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Métodos alternativos usaron uniones metilfosfonato o fósforoamidato en dichos brazos. Otras realizaciones del oligonucleótido antisentido útiles en la práctica de la presente invención son P-metoxioligonucleótidos, P-metoxioligodesoxirribonucleótidos parciales o P-metoxioligonucleótidos.

[0085] En una realización particular la molécula cargadora es un aptómero o un spiegelmer.

[0086] Los aptómeros son ácidos nucleicos D monocatenarios o bicatenarios que interactúan específicamente con una molécula blanco. La fabricación o selección de aptómeros se describe, por ejemplo, en la patente europea EP 0 533 838. Básicamente se llevan a cabo los pasos siguientes. Primero, se proporciona una mezcla de ácidos nucleicos, es decir aptómeros potenciales, en la que cada ácido nucleico comprende típicamente un segmento de varios, preferentemente al menos ocho, nucleótidos aleatorizados subsiguientes. Esta mezcla se pone en contacto a continuación con la molécula blanco mediante lo cual el o los ácidos nucleicos se unen a la molécula blanco, por ejemplo basándose en una mayor afinidad hacia el blanco o en una mayor fuerza de unión, en comparación con la mezcla candidata. El o los ácidos nucleicos de unión se separan a continuación del resto de la mezcla. Opcionalmente, el o los ácidos nucleicos así obtenidos se amplifican usando por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa. Estos pasos se pueden repetir varias veces dando al final una mezcla que tenga una mayor proporción de ácidos nucleicos que se unen específicamente al blanco de los cuales se selecciona después opcionalmente el ácido nucleico de unión final. Estos ácidos nucleicos que se unen específicamente se denominan aptómeros. Es obvio que en cualquier etapa del método para la generación o identificación de los aptómeros se pueden tomar muestras de la mezcla de los ácidos nucleicos individuales para determinar su secuencia usando técnicas corrientes. Está previsto en la presente invención que los aptómeros puedan ser estabilizados, por ejemplo, introduciendo grupos químicos definidos que son conocidos por los expertos en generación de aptómeros. Dicha modificación puede residir por ejemplo en la introducción de un grupo amino en la posición 2' de la porción azúcar de los nucleótidos. Los aptómeros se usan corrientemente como agentes terapéuticos. Sin embargo, también se encuentra previsto en la presente invención que los aptómeros seleccionados o generados de esa manera se puedan usar para la validación del blanco.

[0087] La generación o fabricación de spiegelmers que se pueden usar o generar de acuerdo con la presente invención, dirigidos contra una molécula blanco, se basa en un principio similar. La fabricación de spiegelmers se describe en la solicitud de patente internacional WO 98/08856. Los spiegelmers son ácidos nucleicos L, lo que significa que están compuestos por L-nucleótidos al contrario que los aptómeros que están compuestos por D-nucleótidos como son los aptómeros. Los spiegelmers se caracterizan por el hecho de que tienen una estabilidad muy alta en el sistema biológico y, comparable a los aptómeros, interactúan específicamente con la molécula blanco contra la cual son dirigidos. Con el propósito de generar spiegelmers, se crea una población heterogénea de ácidos nucleicos D y esta población se pone

en contacto con el antípoda óptico de la molécula blanco, es decir. con el enantiómero D del enantiómero L de origen natural de la molécula blanco. A continuación, se separan los ácidos nucleicos D de los que no interactúan con el antípoda óptico de la molécula blanco. En cambio, los ácidos nucleicos D que interactúan con el antípoda óptico de la molécula blanco se separan, opcionalmente se determinan y/o se secuencian, y a continuación se sintetizan los ácidos nucleicos L correspondientes basándose en la información de la secuencia del ácido nucleico obtenida de los ácidos nucleicos D. Esos ácidos nucleicos L que son idénticos en términos de secuencia con los ácidos nucleicos D mencionados precedentemente que interactúan con el antípoda óptico de la molécula blanco, interactuarán específicamente con la molécula blanco de origen natural en vez de con su antípoda óptico. De manera similar a la del método para la generación de aptómeros también es posible repetir los diversos pasos varias veces y por lo tanto incrementar aquellos ácidos nucleicos que interactúan específicamente con el antípoda óptico de la molécula blanco.

[0088] En una realización particular la molécula cargadora es un oligodesoxinucleótido bicatenario corto que actúa como una molécula señuelo que se une específicamente a factores de transcripción dentro de la célula. Esas moléculas señuelo se dice que son tomadas eficazmente por las células sin necesidad de portadores específicos. Se espera que la eficacia y la administración citoplasmática puedan ser mejoradas aún más por la conjugación a un CPP de acuerdo con la presente invención

[0089] En una realización particular la molécula cargadora es un anticuerpo.

[0090] La fabricación de anticuerpos es conocida por los expertos en el área, y se describe, por ejemplo, en Harlow, E., Y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Preferentemente, los anticuerpos monoclonales se pueden usar en relación con la presente invención los cuales se pueden fabricar siguiendo el protocolo de Köhler y Milstein y otros desarrollos basados en este. Anticuerpos según se usa en este documento, incluye, pero no exclusivamente, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o derivados como los fragmentos Fab, fragmentos Fc y anticuerpos monocatenarios, en tanto sean adecuados y capaces de unirse a la proteína quinasa N beta. Aparte de los anticuerpos monoclonales también se pueden usar y/o generar anticuerpos policlonales. La generación de anticuerpos policlonales también es conocida por los expertos en el área, y se describe, por ejemplo, en Harlow, E., Y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Preferentemente, los anticuerpos usados con fines terapéuticos son anticuerpos humanizados o humanos según se definió antes.

[0091] Los anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención pueden tener uno o varios marcadores o etiquetas. Dichos marcadores o etiquetas pueden ser útiles para detectar el anticuerpo en su aplicación diagnóstica o en su aplicación terapéutica. Preferentemente los marcadores y etiquetas se seleccionan del grupo que comprende avidina, estreptavidina, biotina, oro y fluoresceína y se usan, por ejemplo, en métodos de ELISA. Esos y otros marcadores así como métodos se describen, por ejemplo, en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988).

[0092] También está previsto en la presente invención que la etiqueta o marcador tenga otra función aparte de la detección, como la interacción con otras moléculas. Dicha interacción puede ser, por ejemplo, la interacción específica con otros compuestos. Esos otros compuestos pueden ser los inherentes al sistema donde se usa el anticuerpo como el organismo humano o animal, o la muestra que se analiza usando el anticuerpo respectivo. Los marcadores adecuados pueden ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína con sus compañeras de interacción específicas como avidina y estreptavidina y análogos, que estén presentes en los respectivos compuestos o estructuras para interactuar con el anticuerpo marcado o etiquetado de esa manera.

[0093] En una realización particular la molécula cargadora es un péptido que se une a un blanco específico.

[0094] Dichos péptidos se pueden generar usando métodos de acuerdo con el estado actual de la tecnología como expresión en la superficie de fagos. Básicamente se genera una colección de péptidos, por ejemplo en forma de fagos, y este tipo de colección se pone en contacto con la molécula blanco respectiva. A continuación esos péptidos que se unen a la molécula blanco se eliminan de la respectiva reacción, preferentemente como un complejo con la molécula blanco. Es sabido por los expertos que las características de unión, al menos hasta cierto grado, dependen del mecanismo experimental realizado particularmente como la concentración de sal y similares. Después de separar esos péptidos que se unen a la molécula blanco, con mayor afinidad o mayor fuerza, de los integrantes de la colección que no se unen, y opcionalmente también después de separar la molécula blanco del complejo de molécula blanco y péptido, el o los péptidos respectivos se pueden caracterizar. Antes de la caracterización se realiza opcionalmente un paso de amplificación como, por ejemplo, mediante propagación de los fagos que codifican al péptido. La caracterización comprende preferentemente la secuenciación de los péptidos que se unen al blanco. Básicamente, los péptidos no están restringidos en su longitud, sin embargo, se obtienen preferentemente en los métodos respectivos, péptidos que tienen preferentemente longitudes entre aproximadamente 8 y 20 aminoácidos. El tamaño de las colecciones puede ser de aproximadamente 10^2 a 10^{18} , preferentemente de 10^8 a 10^{15} péptidos diferentes, sin embargo, no está limitado a esos valores.

[0095] Una forma particular de péptidos que se unen a los blancos son los denominados "anticalinas" que se describen, entre otros, en la solicitud de patente alemana DE 197 42 706.

5 **[0096]** En otro aspecto la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la presente invención. Dicho ácido nucleico puede ser derivado fácilmente por un experto basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido y en el código genético. Se reconocerá que dependiendo del organismo huésped la secuencia particular se puede adaptar al uso del codón del organismo huésped respectivo. La secuencia de ácidos nucleicos para los péptidos que más se prefieren de acuerdo con la presente invención se puede tomar de SEC. ID N°: 26 y SEC. ID N°: 27.

10 **[0097]** En otro aspecto la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un péptido, donde dicho péptido consiste en un péptido de acuerdo con la presente invención y otro péptido o proteína, y donde dicha proteína se denomina generalmente péptido/proteína de fusión. De acuerdo con los protocolos conocidos por los expertos en el área este ácido nucleico puede servir para la expresión y purificación de proteínas recombinantes, las cuales comprenden como una parte el o los péptidos de acuerdo con la presente invención, o se puede usar en combinación con portadores adecuados en estrategias terapéuticas generalmente denominadas terapia génica. En una realización preferida el ácido nucleico que codifica el otro péptido fusionado al ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con la presente invención, codifica un péptido que sirve como un péptido apto para vacunación. En otra realización preferida el ácido nucleico codifica un péptido, donde el péptido actúa preferentemente como un inhibidor competitivo de las interacciones moleculares dentro de la célula. En otra realización preferida el ácido nucleico codifica un péptido, donde el péptido actúa preferentemente como un sustrato para una reacción enzimática dentro de la célula. En otra realización preferida el ácido nucleico codifica el dominio de una proteína, donde el dominio actúa preferentemente como un inhibidor competitivo de las interacciones moleculares dentro de la célula. En otra realización preferida el ácido nucleico codifica una enzima, donde la enzima es preferentemente del grupo de las hidrolasas.

25 **[0098]** Aún en otro aspecto la invención se refiere a una proteína de fusión según se define en este documento y más particularmente a una proteína de fusión codificada por un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención.

30 **[0099]** En otro aspecto la presente invención se refiere a una composición que comprende un complejo de acuerdo con la presente invención, una composición que comprende un péptido de acuerdo con la presente invención, una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la presente invención, una composición que comprende un péptido de acuerdo con la presente invención y una molécula cargadora, una composición que comprende una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención, una composición que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión y una composición que comprende lactoferrina humana y una molécula cargadora. Entre las aptitudes de un experto está que dichas composiciones de acuerdo con la presente invención puedan contener uno o varios de los péptidos de acuerdo con la presente invención, uno o varios de los ácidos nucleicos de la presente invención y/o una o varias de las moléculas cargadoras. Con relación a esto se prefiere que el término "vario/as" signifique varias especies diferentes de los respectivos compuestos o moléculas. Los expertos reconocerán que la composición comprende típicamente una multitud de las especies individuales del péptido de la presente invención, del ácido nucleico que codifica dicho péptido y/o de la molécula cargadora. Con relación a esto se entiende que se puede usar cualquiera de las moléculas cargadoras descritas en este documento.

45 **[0100]** En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las composiciones o de sus constituyentes descritos en este documento como agentes de transfección, como un medicamento o como un agente de diagnóstico. En el caso en que la composición se use como un medicamento o como una composición farmacéutica, la molécula cargadora es preferentemente un principio farmacéuticamente activo. Dichos principios farmacéuticamente activos pueden ser un quimioterápico por ejemplo daunorubicina o péptidos que interfieren con las interacciones moleculares dentro de la célula, o cualquiera de las moléculas descritas en este documento como moléculas cargadoras, donde preferentemente dichas moléculas cargadoras son farmacéuticamente activas o preformas de dichas moléculas farmacéuticamente activas. En el caso de que la composición se use como un agente de diagnóstico, preferentemente la molécula cargadora es un marcador para diagnóstico. Dicho marcador para diagnóstico pueden ser un sustrato fluorogénico para detectar la actividad de una proteasa patológicamente pertinente, por ejemplo una caspasa involucrada en la iniciación y ejecución de apoptosis, dentro de la célula.

55 **[0101]** Está previsto en la presente invención que los péptidos de acuerdo con la presente invención sean administrados preferentemente a un tipo específico de células, o tejido u órgano que comprenda dicho tipo específico de células. En una realización preferida dicha administración específica es mediada a través de una porción dirigida o molécula dirigida que también están, en su conjunto, mencionadas en este documento como entidades dirigidas.

60 **[0102]** En una realización más preferida, dicha porción dirigida es parte del péptido de acuerdo con la presente invención o parte de la molécula cargadora. Alternativamente o adicionalmente, dicha porción dirigida es parte del complejo o la composición de acuerdo con la presente invención.

5 [0103] La entidad dirigida se selecciona preferentemente del grupo que comprende péptidos, proteínas, incluidos los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, aptómeros, spiegelmers y ligandos que se unen a los receptores de la superficie celular. Los expertos reconocerán que en principio se puede usar una porción o molécula compañera de cualquier combinación de los compañeros de interacción que proporcione una focalización, como una entidad dirigida. Esto incluye el uso de ligandos para los receptores que se expresan y más particularmente se sobreexpresan en un tipo distinto de célula o ligandos o moléculas que se expresan y más particularmente se sobreexpresan en un tipo distinto de célula. En el último caso el compañero de interacción particularmente prominente de estos, que actúa como una entidad dirigida se selecciona del grupo que comprende anticuerpos, aptómeros, spiegelmers, péptidos de unión altamente específica y anticalinas. Este tipo de compañeros de interacción y su especificidad por un tipo particular de célula son conocidos por los expertos. Entre otros, la proteína ErbB2 es específica para las células de cáncer de mama. Concordantemente, un anticuerpo dirigido contra ellas es una entidad dirigida adecuada.

10 [0104] En una realización preferida, la porción dirigida se incluye en o sobre las partículas descritas en este documento que se pueden usar como moléculas cargadoras. Debido al tamaño de dichas partículas, el uso de una entidad dirigida más voluminosa como un anticuerpo es preferible en relación con dicha realización.

15 [0105] En otra realización preferida, el CPP, es decir un péptido de acuerdo con la presente invención se acopla a una porción que enmascara intramolecularmente al CPP y evita que el CPP actúe como un CPP. Se incorpora un enlace que puede ser escindido enzimáticamente entre el CPP y la porción enmascarante. Dicho método de enmascaramiento intramolecular fue descrito para la focalización de un fluoróforo conjugado en el CPP nonaarginina. El CPP nonaarginina se unió a un tramo de ácido hexaglutámico a través de un péptido de unión correspondiente al sitio de escisión para las metaloproteinasas 2 y 9 de matriz. Estas proteasas son segregadas por las células tumorales en altas concentraciones. La secreción de las proteasas escinde selectivamente el constructo CPP-máscara en la proximidad de las células tumorales, permitiendo por lo tanto la absorción eficaz del constructo CPP-molécula cargadora en las células tumorales (T. Jiang et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 101, 17867-17872, 2004). En cuanto a esto, esta realización representa un medio de focalización o administración eficaz para la focalización y/o la administración específica al tumor.

20 [0106] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser fabricadas mediante procesos bien conocidos en el área, por ejemplo, mediante los procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, pulverización, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

25 [0107] Las composiciones farmacéuticas para usar de conformidad con la presente invención se pueden formular por lo tanto de la manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

30 [0108] Para la inyección, los compuestos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en soluciones amortiguadoras fisiológicamente compatibles como la solución de Hanks, la solución de Ringer o la solución amortiguadora fisiológica salina. Para la administración transmucosa se usan en la formulación, penetrantes adecuados para la barrera que se va a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en el área.

35 [0109] Las formulaciones que promueven la penetración de la epidermis son conocidas en farmacología, y pueden encontrar uso en el tratamiento de muchas afecciones cutáneas, por ejemplo, pero no exclusivamente, en psoriasis y micosis. Las formulaciones que promueven la penetración de la epidermis y las capas subyacentes de la piel también son conocidas, y se pueden usar para aplicar composiciones de la presente invención, por ejemplo, a músculos o articulaciones subyacentes. En algunas realizaciones terapéuticas preferidas, la formulación que comprende composiciones de la presente invención que administran compuestos para el alivio del traumatismo o la osteoartritis se pueden administrar aplicando una crema, ungüento o gel a la piel que cubre una articulación afectada.

40 [0110] Se puede usar la administración oral y parenteral donde el péptido y/o el complejo se preparan suficientemente estables para aguantar el fuerte entorno proteolítico del intestino. Si es así, la composición de acuerdo con la presente invención se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el área. Dichos portadores permiten que los compuestos de la invención sean formulados como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y análogos, para la ingestión oral por un paciente que va a ser tratado. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden elaborar con el uso de un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos después de agregar los auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos de núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar desintegrantes, como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una de sus sales como alginato de sodio.

- 5 **[0111]** Los núcleos de las grajeas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcares que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, solución de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los recubrimientos de los comprimidos o las grajeas para identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.
- 10 **[0112]** Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste holgado hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste holgado pueden contener los principios activos mezclados con un relleno como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en formas farmacéuticas adecuadas para dicha administración.
- 15 **[0113]** Las preparaciones para administración bucal pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de la manera convencional. Para los péptidos pequeños y los complejos de la invención, esto puede resultar útil.
- 20 **[0114]** Para la administración por inhalación, la composición de acuerdo con la presente invención se administra convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, mediante el uso de un propelente apropiado, p. ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la forma farmacéutica puede ser determinada proveyendo de una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos por ejemplo de gelatina para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.
- 25 **[0115]** Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. De esta manera también es posible focalizar un órgano, tejido, sitio de un tumor, sitio de inflamación, etc. Las formulaciones para infección se pueden presentar en una forma farmacéutica, por ejemplo, en ampollas o un envase multidosis, con un conservante agregado. Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación como suspendentes, estabilizantes y/o dispersantes.
- 30 **[0116]** Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de las composiciones en forma soluble en agua. Además se pueden preparar suspensiones de las composiciones como suspensiones oleosas inyectables adecuadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas inyectables pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de las composiciones para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- 35 **[0117]** Alternativamente, uno o más componentes de la composición puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, p. ej. agua estéril apirógena, antes de su uso.
- 40 **[0118]** Las composiciones también se pueden formular como composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases de supositorios convencionales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- 45 **[0019]** Además de las formulaciones descritas antes, la composición de acuerdo con la presente invención también se puede formular como una preparación en depot. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable), o como parte de un implante sólido o semisólido que puede ser o no autodegradado en el organismo, o resinas de intercambio iónico, o uno o más componentes de la composición se puede formular como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como sales moderadamente solubles.
- 50 **[0120]** Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase gel adecuados. Los ejemplos de dicho portadores o excipientes incluyen, pero no exclusivamente, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros como polietilenglicoles.
- 55 **[0121]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito buscado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.
- 60
- 65

[0122] La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz forma parte de las capacidades de los expertos en el área, especialmente a la luz de la detallada divulgación provista en este documento.

[0123] Para cualquier compuesto utilizado en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en un cultivo celular (donde conciernen las moléculas inhibitoras). Dicha información se puede usar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos.

[0124] La toxicidad y eficacia terapéutica de una composición de la presente invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos corrientes en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como el cociente entre DL_{50} y DE_{50} . Se prefieren los compuestos que tienen índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de esos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para usar en humanos. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser elegidas por cada médico a la vista de la afección del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1).

[0125] La cantidad de la composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que está en tratamiento, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, del modo de administración y del juicio del médico que la prescribe.

[0126] Una composición farmacéutica que comprende un péptido de una composición de acuerdo con la presente invención se puede suministrar de modo que el péptido y una o más de las moléculas cargadoras estén en el mismo envase, ya sea en solución, en suspensión o en forma de polvo. El péptido de acuerdo con la presente invención también se puede proporcionar por separado de una o más de las moléculas cargadoras, y se puede mezclar con una o más de las moléculas cargadoras antes de la administración. Diversas opciones de acondicionamiento son posibles y conocidas por los expertos dependiendo, entre otros, de la vía y el mecanismo de administración. Por ejemplo, cuando el péptido de acuerdo con la presente invención se suministra por separado de una o más de las moléculas cargadoras, las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase que tenga más de una cámara y en el cual se pueda romper, rasgar o fundir una barrera para hacer posible la mezcla del péptido de acuerdo con la presente invención con la molécula cargadora. Alternativamente, dos elementos provistos por separado se pueden mezclar en un envase aparte, opcionalmente con la adición de uno o más de otros portadores, soluciones, etc. En un mismo envase se pueden proporcionar una o más formas farmacéuticas que contengan la molécula cargadora. El envase o el dispositivo dispensador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un portador farmacéuticamente compatible también se pueden preparar, colocar en un envase adecuado, y rotular para el tratamiento de una afección indicada. Las afecciones adecuadas indicadas en el rótulo pueden incluir cualquier enfermedad que pueda ser tratada, prevenida o diagnosticada usando las composiciones de acuerdo con la presente invención. En particular, la invención es idealmente adecuada para la terapia génica.

[0127] En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de un paciente que comprende la administración de una composición de acuerdo con la presente invención.

[0128] En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de un paciente que comprende la administración o el uso de una composición de acuerdo con la presente invención.

[0129] Está previsto en la presente invención que dicho ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la presente invención se puede usar como una vacuna o parte de una vacuna. Preferentemente la vacuna comprende un ácido nucleico, más preferentemente un ARN, que codifica un antígeno que es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria en un organismo huésped, donde el ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la presente invención y el ácido nucleico que codifica dicho antígeno se administran a dicho organismo huésped. Dicha administración se puede hacer por separado o de manera combinada. En otra realización, el ácido nucleico respectivo puede estar contenido o comprendido en un vector, más preferentemente un vector de expresión que permita la expresión de uno o más ácidos nucleicos en dicho organismo huésped. Los otros elementos de dicho vector y en particular de dicho vector de expresión son conocidos por los expertos y comprenden, entre otros, uno o varios de los elementos siguientes: un promotor, un potenciador y un terminador. El antígeno es preferentemente un antígeno que está relacionado con la enfermedad que se va a tratar o prevenir mediante la vacuna de acuerdo con la presente invención. Además, la vacuna también puede contener constituyentes que ejercen un efecto denominado coadyuvante y esos que actúan como iniciadores de las respuestas de los linfocitos T cooperadores.

[0130] Aún en otra realización, la presente invención se refiere a un equipo para transfección, para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que comprende una composición de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente uno o varios elementos seleccionados del grupo que comprende

[0131] La presente invención se ilustrará ahora más detalladamente por referencia a las figuras y a los ejemplos siguientes de los cuales se pueden extraer otras características, realizaciones y ventajas. En particular, la

- 5 Fig. 1 muestra un diagrama que representa la concentración dependiente de la absorción para diversos CPP marcados con carboxifluoresceína en su extremo N-terminal, expresada como la medida en que la fluorescencia está asociada a las células; péptido hLF se refiere a un péptido que consta de los aminoácidos 38 a 59 de acuerdo con SEC. ID N°: 1, péptido bLF se refiere a un péptido que consta de los aminoácidos 33 a 50 de acuerdo con SEC. ID N°: 2; la fluorescencia asociada a las células se determinó por citometría de flujo;
- 10 Fig. 2 muestra una serie de microfotografías obtenidas por microscopía de barrido confocal por láser que indica la dependencia que tiene la concentración de la distribución intracelular del péptido derivado de la lactoferrina humana y el péptido derivado de la lactoferrina bovina (véase Fig. 1) a diversas concentraciones;
- 15 Fig. 3A es un diagrama que muestra el impacto de varios inhibidores de la endocitosis sobre la absorción de un péptido hLF marcado con fluoresceína (secuencia del péptido de acuerdo con la Fig. 1) siendo la concentración de fluoresceína-hLF 5 μ M (EIPA, 5-(N-etil-N-isopropil)amilorida; M β CD, metil β -ciclodextrina; CPZ, clorpromazina); la absorción se determinó por citometría de flujo. Las barras de error representa la desviación media de los triplicados;
- 20 Fig. 3B es un diagrama que muestra el impacto de varios inhibidores de la endocitosis sobre la absorción de un péptido hLF marcado con fluoresceína (secuencia del péptido de acuerdo con la Fig. 1) siendo la concentración de hLF 20 μ M;
- 25 Fig. 4 muestra fotografías obtenidas por microscopía de barrido confocal por láser que indican la influencia de los inhibidores de la endocitosis sobre la absorción del péptido hLF marcado con fluoresceína a una concentración del péptido de 2 o 20 μ M en células HeLa;
- 30 Fig. 5 es un diagrama que muestra la medida de la absorción del péptido hLF marcado con fluoresceína correspondiente a los aminoácidos 38 a 59 de acuerdo con SEC. ID N°: 1 en comparación con sus formas truncadas que ilustran las relaciones estructura-actividad correspondientes a los aminoácidos 40 a 55 de acuerdo con SEC. ID N°: 1 (péptido LF1) y los aminoácidos 40 a 50 de acuerdo con SEC. ID N°: 1 (péptido LF2); y
- 35 Fig. 6 es un diagrama que representa la citotoxicidad del péptido hLF expresada como la viabilidad celular en porcentaje a diversas concentraciones del péptido hLF marcado con fluoresceína para las células HeLa incubadas durante diferentes tiempos de incubación; para cada par de columnas, la primera columna se refiere a las células incubadas con péptido durante 6 horas y la segunda columna a células incubadas con péptido durante 0.5 hora.

40 **Ejemplo 1: Procedimientos experimentales**

[0132] Células y reactivos. La línea celular de carcinoma de cuello uterino humano HeLa se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HeLa se mantuvieron en medio RPMI 1640 con glutamina estabilizada y 2.0 g/L de NaHCO₃ (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con 10% de suero de feto de ternero (PAN Biotech). La clorpromazina se obtuvo de Calbiochem (Bad Soden, Alemania), 5-(N-etil-N-isopropil)amilorida (EIPA), metil- β -ciclodextrina (M β CD) y MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolilo] se obtuvieron de Sigma (Deisenhofen, Alemania).

[0133] Síntesis de péptidos. Los péptidos se compraron a microcolecciones EMC (Tübingen, Alemania). La pureza de todos los péptidos se determinó por HPLC analítica. La identidad de los péptidos se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los péptidos con una pureza menor de 85% se purificaron por HPLC preparativa. La pureza de todos los péptidos utilizados fue > 95% (214 nm HPLC). Los péptidos fueron marcados en el extremo N-terminal con carboxifluoresceína según se describió (Fischer et al., Bioconjugate Chem. 14, 653-660, 2003).

[0134] Soluciones madre de péptidos. Los péptidos se disolvieron en DMSO hasta concentraciones de 10 mM. Estas soluciones madre se diluyeron posteriormente con PBS o medio. Las concentraciones de péptidos de las soluciones madre en DMSO se determinaron basándose en la absorción de carboxifluoresceína por espectroscopía UV/VIS de una dilución 1:100 en solución amortiguadora Tris 0.1 M/HCl (pH 8.8) midiéndose las absorciones a 492 nm y suponiendo un coeficiente de extinción molar de carboxifluoresceína de 75 000 L/(mol. cm).

[0135] Citometría de flujo. Para determinar la eficacia de carga del péptido, se sembraron células HeLa a una densidad de 50 000 por pocillo en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) en RPMI 1640 que contenía suero. Un día más tarde, las células se lavaron con medio y se incubaron en 300 μ L RPMI 1640, que contenía péptidos en las concentraciones adecuadas durante 30 minutos. Cada concentración/condición se analizó por triplicado. Luego

de la incubación, las células se lavaron con medio, se separaron por tripsinización durante 5 minutos, se suspendieron en PBS helado que contenía 0.1% (p/v) de BSA, y se midieron inmediatamente por citometría de flujo (BD FACS Calibur System, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). En cada caso, se obtuvo la fluorescencia de 7000 células vitales. Las células vitales fueron compartimentadas basándose en la dispersión lateral y hacia adelante.

5 Ejemplo 2: Eficacia de la absorción de péptidos derivados de la lactoferrina humana y bovina

10 [0136] Se sintetizaron péptidos derivados de la lactoferrina humana y bovina mediante síntesis de péptidos en fase sólida. Para detectar la absorción y la distribución subcelular en células vivas, se marcaron ambos péptidos con carboxifluoresceína en el extremo N-terminal. Para determinar si los péptidos derivados de la lactoferrina poseían actividad como péptidos de penetración celular, se determinó la fluorescencia asociada a las células en células HeLa incubadas con péptido bLF o péptido hLF por citometría de flujo. Se seleccionaron Antp y el péptido Tat como CPP bien establecidos para la comparación.

15 [0137] Para las cuatro péptidos, la fluorescencia celular medida por citometría de flujo, aumentó con la concentración de péptido como se representa en la Fig. 1.

Ejemplo 3: Relación estructura-actividad

20 [0138] Con 22 aminoácidos, el péptido hLF es un CPP de longitud intermedia. La nonaarginina tiene solo nueve aminoácidos, los CPP populares transportan 27. Cuatro de los siete aminoácidos catiónicos y los aminoácidos aromáticos están ubicados en la secuencia anidada dentro de los residuos de cisteína. En la proteína completa, estos residuos de cisteína forman un puente disulfuro que fuerza al dominio a una conformación en bucle. Además, se analizó la absorción celular de los péptidos truncados (LF1 y LF2, tabla 1) que carecen de residuos de cisteínas terminales y se los comparó con los que contienen un residuo de cisteína.

25 **Tabla 1. Estructuras primarias de los péptidos utilizados en este estudio.** Todos los péptidos fueron sintetizados como péptido amidados.

Fluo representa 5(6)-carboxifluoresceína, CONH₂ el extremo C-terminal amidado del péptido.

Entrada	Péptido	Secuencia
1	Péptido Tat	Fluo-YGRKKRRQRRR-CONH ₂
2	Péptido Antp	Fluo-RQIKIWFQNRRMKWKK-CONH ₂
3	Péptido hLF	Fluo-KCFQWQRNURKVRGPPVSCIKR-CONH ₂
4	Péptido bLF	Fluo-PEWFKCRRWQWRMKKLG-CONH ₂
5	Péptido LF1	Fluo-FQWQRNMRKVRGPPVS-CONH ₂
6	Péptido LF2	Fluo-FQWQRNMRKVR-CONH ₂

30 [0139] Los resultados se representan en la Fig. 5.

[0140] La absorción de ambos péptidos que carecen de cisteínas solo fue una décima parte de la absorción del péptido hLF que contiene los dos residuos de cisteína.

Ejemplo 4: Citotoxicidad del péptido hLF

35 [0141] En los experimentos descritos antes, usando un rango de concentración del péptido hLF hasta 40 µM, no se pudieron observar efectos citotóxicos. Sin embargo, para la microscopia de células vivas de absorción de péptidos se emplearon en la mayoría de los casos tiempos de incubación bastante cortos de menos de una hora. Por consiguiente también se analizó si con tiempos de incubación más largos y mayores concentraciones, el péptido afectaba la viabilidad celular. Las células HeLa se incubaron con el péptido hLF a concentraciones que variaron de 1.25 µM hasta 160 µM durante 6 o 0.5 horas. Posteriormente la viabilidad celular se determinó usando una prueba MTT. Esos resultados se representan en la Fig. 6.

45 [0142] Cuando las células se incubaron con péptido solo durante 30 minutos, no se observó citotoxicidad para concentraciones hasta 40 µM. Después de 6 horas, la viabilidad celular se redujo ligeramente para concentraciones de péptido superiores a 5 µM. A concentraciones mayores de 40 µM todas las células fueron eliminadas.

[0143] Las características de la presente invención dadas a conocer en esta especificación, el listado de secuencias, las reivindicaciones y/o las figuras pueden ser, tanto por separado como en cualquiera de sus combinaciones, material para realizar la invención en sus diversas formas.

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

[0144]

10 <110> Eberhard Karl Universität Tübingen
 <120> Péptidos útiles como péptidos de penetración celular
 <130> 205ut01.wo
 <150> EP 05028755.6
 <151> 2005-12-30
 <160> 30
 <170> PatentIn versión 3.1
 15 <210> 1
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(711)
 <223> lactoferrina humana
 <220>
 25 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(19)
 <223>
 <400> 1

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
20 25 30

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
 35 40 45
 Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
 50 55 60
 Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
 65 70 75 80
 Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
 85 90 95
 Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
 100 105
 Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
 115 120 125
 Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
 130 135 140
 Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
 165 170 175
 Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
 180 185 190
 Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
 195 200 205
 Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly
 210 215 220
 Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp
 225 230 235 240
 Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg
 245 250 255
 Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser
 260 265 270
 His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp
 275 280 285
 Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro
 290 295 300

Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe
 305 310 315 320
 Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser
 325 330 335
 Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg
 340 345 350
 Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys
 355 360 365
 Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu
 370 375 380
 Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
 385 390 395 400
 Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
 405 410 415
 Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
 420 425 430
 Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
 435 440 445
 Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
 450 455 460
 Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His
 465 470 475 480
 Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu
 485 490 495
 Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser
 500 505 510
 Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile
 515 520 525
 Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg
 530 535 540
 Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly
 545 550 555 560
 Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly
 565 570 575
 Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala Asp Phe Ala

Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln
 20 25 30
 Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu
 35 40 45
 Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys
 50 55 60
 Ile Arg Ala Ile Ala Glu Lys Lys Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Arg Asp Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val
 85 90 95
 Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr
 100 105 110
 Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Gln Leu
 115 120 125
 Gln Gly Arg Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
 130 135 140
 Ile Ile Pro Met Gly Ile Leu Arg Pro Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Glu Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Lys Phe Phe Ser Ala Ser Cys
 165 170 175
 Val Pro Cys Ile Asp Arg Gln Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys
 180 185 190
 Lys Gly Glu Gly Glu Asn Gln Cys Ala Cys Ser Ser Arg Glu Pro Tyr
 195 200 205
 Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp
 210 215 220
 Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys
 225 230 235 240
 Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn Asn Ser Arg Ala
 245 250 255
 Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His
 260 265 270
 Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Lys
 275 280 285

Leu Leu Ser Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Arg Ser
 290 295 300
 Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Pro Gly Gln Arg Asp Leu Leu Phe Lys
 305 310 315 320
 Asp Ser Ala Leu Gly Phe Leu Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala
 325 330 335
 Leu Tyr Leu Gly Ser Arg Tyr Leu Thr Thr Leu Lys Asn Leu Arg Glu
 340 345 350
 Thr Ala Glu Glu Val Lys Ala Arg Tyr Thr Arg Val Val Trp Cys Ala
 355 360 365
 Val Gly Pro Glu Glu Gln Lys Lys Cys Gln Gln Trp Ser Gln Gln Ser
 370 375 380
 Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Thr Ala Ser Thr Thr Asp Asp Cys Ile
 385 390 395 400
 Val Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Gly
 405 410 415
 Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu
 420 425 430
 Asn Arg Lys Ser Ser Lys His Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro
 435 440 445
 Thr Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly
 450 455 460
 Leu Thr Trp Asn Ser Leu Lys Asp Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val
 465 470 475 480
 Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Val Asn Gln
 485 490 495
 Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro
 500 505 510
 Gly Ala Asp Pro Lys Ser Arg Leu Cys Ala Leu Cys Ala Gly Asp Asp
 515 520 525
 Gln Gly Leu Asp Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu Lys Tyr Tyr Gly
 530 535 540
 Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp Val Ala
 545 550 555 560

Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Thr
565 570 575

Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys
580 585 590

Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys His Leu
595 600 605

Ala Val Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala
610 615 620

His Val Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn
625 630 635 640

Gly Lys Asn Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys
645 650 655

Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Lys Leu Gly Gly
660 665 670

Arg Pro Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr Val Thr Ala Ile
675 680 685

Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Ala
690 695 700

Phe Leu Thr Arg
705

<210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> sintético
<220>
<221> CARACT_MIS
<223> Sintético
<400> 3

5

10

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser cys Ile Lys Arg

20

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> sintético
<220>
<221> CARACT_MISC
<223> sintético
<400> 4

15

20

cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

25

30

<223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <400> 5

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 6

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 7

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
20

<210> 8
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <400> 8

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
20

<210> 9
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (9).(9)
 <223> norvalina
 <400> 9

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20

5
 <210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 10
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 10

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20

15
 <210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 20
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 11

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15

Ser Cys

25
 <210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 30
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 12

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15

Ser Cys

35
 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 40
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <220>
 45
 <221> CARACT_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> norvalina
 <400> 13

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

5
 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 10
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 14

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

15
 <210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético <220>
 20
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <220>
 <221> Característica_Misc
 25
 <222> (8).. (8)
 <223> norleucina
 <400> 15

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

30
 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 35
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <400> 16

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

40
 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 45
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 17

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

50
 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> norvalina
 <400> 18
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 19
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> norleucina
 <400> 20
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <400> 21
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético
 <400> 22
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético .
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> norvalina
 <400> 23
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MIS
 <223> sintético
 <400> 24
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC <223> Sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> norleucina
 <400> 25
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 26
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <223> Sintético
 <400> 26
aaatgcttcc aatggcaaag gaatatgaga aaagtgcgtg gccctcctgt cagctgcata 60
aagaga 66

<210> 27
 <211> 2136
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <223> lactoferrina humana
 <400> 27

atgaaacttg tcttcctcgt cctgctgttc ctcggggccc tcggactgtg tctggctggc 60
 cgtaggagaa ggagtgttca gtggtgcgcc gtatcccaac ccgaggccac aaaatgcttc 120
 caatggcaaa ggaatatgag aaaagtgcgt ggccctcctg tcagctgcat aaagagagac 180
 tcccccatcc agtgtatcca ggcattgctg gaaaacaggg ccgatgctgt gacccttgat 240
 ggtggtttca tatacaggc aggcctggcc ccctacaac tgcgacctgt agcggcggaa 300
 gtctacggga ccgaaagaca gccacgaact cactattatg ccgtggctgt ggtgaagaag 360
 ggcggcagct ttcagctgaa cgaactgcaa ggtctgaagt cctgccacac aggccttcgc 420
 aggaccgctg gatggaatgt ccctacaggg aacttcctgc cattcttgaa ttggacgggt 480
 ccacctgagc ccattgaggc agctgtggcc aggttcttct cagccagctg tgttcccggg 540
 gcagataaag gacagttccc caacctgtgt cgctgtgtg cggggacagg ggaaaacaaa 600
 tgtccttct cctcccagga accgtacttc agtactctg gtgccttcaa gtgtctgaga 660
 gacggggctg gagacgtggc ttttatcaga gagagcacag tgtttgagga cctgtcagac 720
 gaggtgaaa gggacgagta tgagtactc tgcccagaca aactcggaa gccagtggac 780
 aagttcaaa actgccatct ggcccgggtc ccttctcatg ccgttgtggc acgaagtgtg 840
 aatggcaagg aggatgccat ctggaatctt ctccgccagg cacaggaaaa gtttgaaaag 900
 gacaagtac cgaattcca gctctttggc tcccctagtg ggcagaaaaga tctgctgttc 960
 aaggactctg ccattgggtt ttcgaggggtg ccccagagga tagattctgg gctgtacctt 1020
 ggctccggct acttcaactgc catccagaac ttgaggaaaa gtgaggagga agtggtgccc 1080
 cggcgtgcgc gggctcgtgtg gtgtgcggtg ggcgagcagg agctgcgcaa gtgtaaccag 1140
 tggagtggct tgagcgaagg cagcgtgacc tgctcctcgg cctccaccac agaggactgc 1200
 atcgcctcgg tgctgaaagg agaagctgat gccatgagtt tggatggagg atatgtgtac 1260
 actgcatgca aatgtggttt ggtgcctgtc ctggcagaga actacaaatc ccaacaaagc 1320
 agtgaccctg atcctaactg tgtggataga cctgtggaag gatattctgc tgtggcgggtg 1380
 gttaggagat cagacactag ccttacctgg aactctgtga aaggcaagaa gtccctgcac 1440
 accgccgtgg acaggactgc aggcctggaat atccccatgg gcctgctctt caaccagacg 1500
 ggctcctgca aatttgatga atatttcagt caaagctgtg cccctgggtc tgacccgaga 1560

tctaattctt gtgctctgtg tattgpcgac gaggagggtg agaataagtg cgtgcccac 1620
 agcaacgaga gatactacgg ctacactggg gctttccggg gcctggctga gaatgctgga 1680
 gacgttgcat ttgtgaaaga tgtcactgtc ttgcagaaca ctgatggaaa taacaatgag 1740
 gcatgggcta aggatttgaa gctggcagac tttgcgctgc tgtgcctcga tggcaaacgg 1800
 aagcctgtga ctgaggctag aagctgccat cttgccatgg ccccgaatca tgccgtgggtg 1860
 tctcggatgg ataaggtgga acgcctgaaa cagggtgctgc tccaccaaca ggctaaattt 1920
 gggagaaatg gatctgactg cccggacaag ttttgcttat tccagtctga aaccaaaaac 1980
 ctctgttca atgacaacac tgagtgtctg gccagactcc atggcaaac aacatatgaa 2040
 aaatatttgg gaccacagta tgtcgcaggc attactaatc tgaaaaagtg ctcaacctcc 2100
 cccctcctgg aagcctgtga attcctcagg aagtaa 2136

5 <210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 10 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> sintético

<220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (9)..(9)
 <223> norleucina
 <400> 28
 5
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20
 <210> 29
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 29
 10
 15
 Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 1 5 10 15
 Ile Thr Cys Val Arg Arg
 20
 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CARACT_MISC
 <223> Sintético
 <400> 30
 20
 25
 Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile
 1 5 10 15
 Thr Cys

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un complejo que comprende un péptido y una molécula cargadora, donde el péptido se deriva de la lactoferrina y es adecuado para actuar como péptido de penetración celular, que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID N°: 03, SEC. ID N°: 4, SEC. ID N°: 29, SEC. ID N°: 30, SEC. ID N°: 7, SEC. ID N°: 8, SEC. ID N°: 9, SEC. ID N°: 10, SEC. ID N°: 28, SEC. ID N°: 11, SEC. ID N°: 12 o SEC. ID N°: 13, SEC. ID N°: 14 o SEC. ID N°: 15 o derivados que tienen un grupo de unión seleccionado del grupo de los tioésteres, donde el grupo de unión reemplaza el enlace disulfuro formado por los residuos de cisteína.
- 10 **2.** El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula cargadora está unida al péptido covalentemente o no covalentemente.
- 3.** El complejo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la molécula cargadora se selecciona del grupo que comprende ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas, y mezclas de cualquiera de ellos.
- 15 **4.** El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la molécula cargadora está presente como una estructura o parte de una estructura, donde la estructura se selecciona del grupo que comprende nanopartículas, micropartículas, liposomas y micelas.
- 5.** El complejo de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende moléculas de ADN, moléculas de ARN, moléculas de ANP, moléculas de ARNip, moléculas antisentido, ribozimas, aptómeros, spiegelmers y moléculas señuelo.
- 20 **6.** El complejo de acuerdo con la reivindicación 3, donde la molécula cargadora es un péptido seleccionado del grupo que comprende péptidos aptos para vacunación.
- 7.** El complejo de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ácido nucleico es una vacuna a base de ácido nucleico.
- 8.** Complejo de acuerdo con la reivindicación 3, donde las nanopartículas y/o las micropartículas comprenden o consisten en un compuesto farmacéuticamente activo.
- 25 **9.** Una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y una molécula cargadora.
- 10.** La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde la molécula cargadora es un ARN adecuado para vacunación.
- 30 **11.** La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde la molécula cargadora es un ácido nucleico que codifica un péptido.
- 12.** La composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 está unido operativamente a la molécula cargadora que es un ácido nucleico que codifica un péptido.
- 35 **13.** La composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 y la molécula cargadora que es un ácido nucleico que codifica un péptido están unidos en el marco.
- 14.** La composición de acuerdo con las reivindicaciones 11 - 13, donde el péptido es un principio farmacéuticamente activo.
- 15.** La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde el ácido nucleico tiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEC. ID N°: 26.
- 40 **16.** Un péptido como el definido de la reivindicación 1 para usar como un péptido de penetración celular (CPP).

17. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 16, donde el péptido de penetración celular (CPP) es adecuado para penetrar la membrana plasmática de las células mamíferas.
18. Un péptido como el definido de la reivindicación 1 para usar como un agente de transfección.
19. El uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 9 - 15 para la fabricación de un medicamento.
- 5 20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, donde la molécula cargadora es un principio farmacéuticamente activo.
21. El uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 9 - 15 para la fabricación de un agente de diagnóstico.
22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, donde la molécula cargadora es un marcador para diagnóstico.

10

Figuras

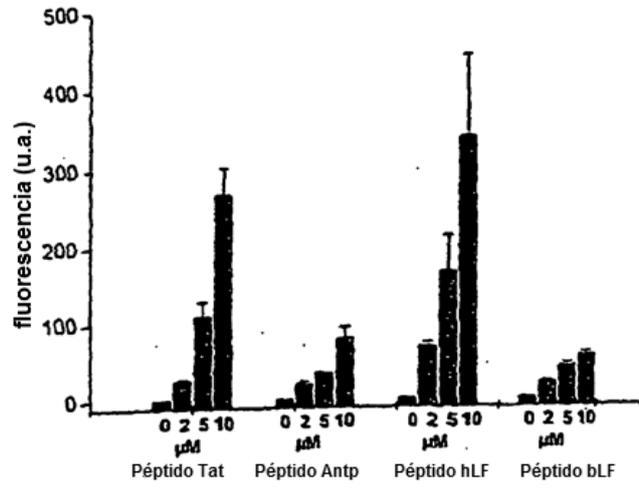


Figura 1

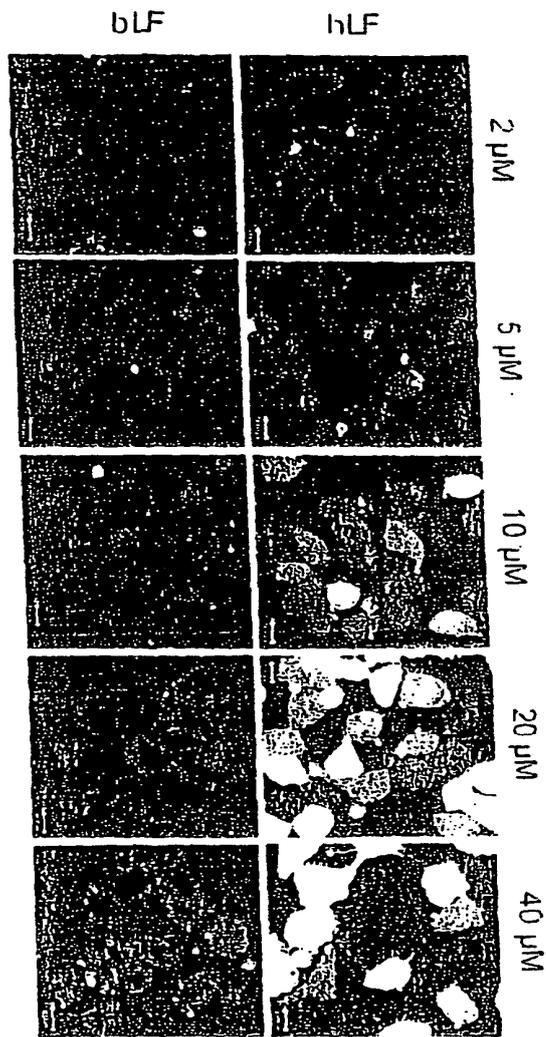
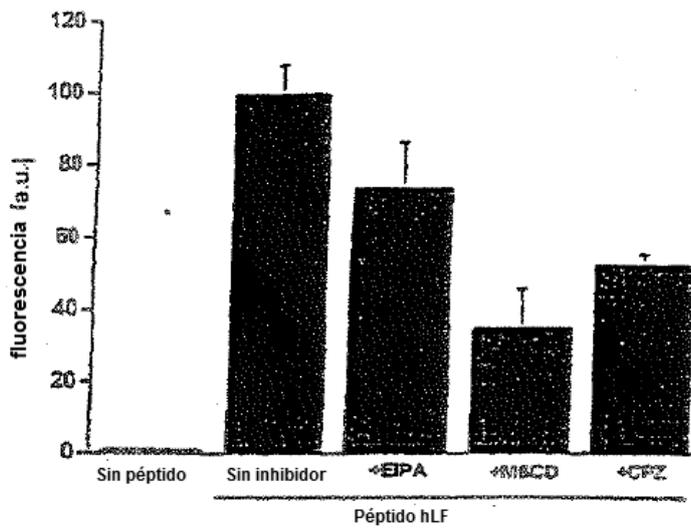


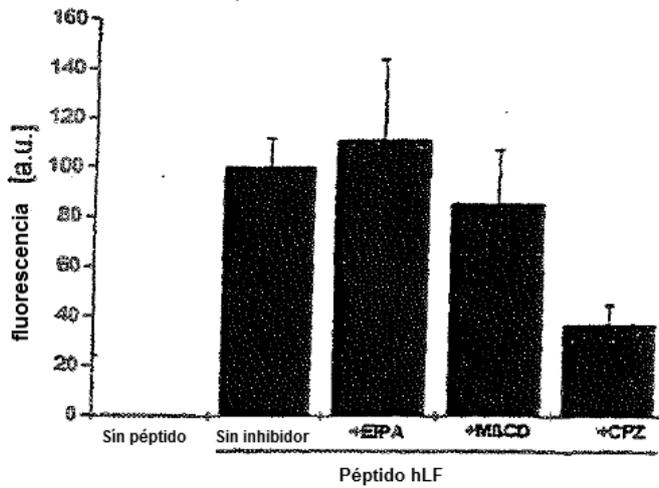
Figura 2

Figura 3

A



B



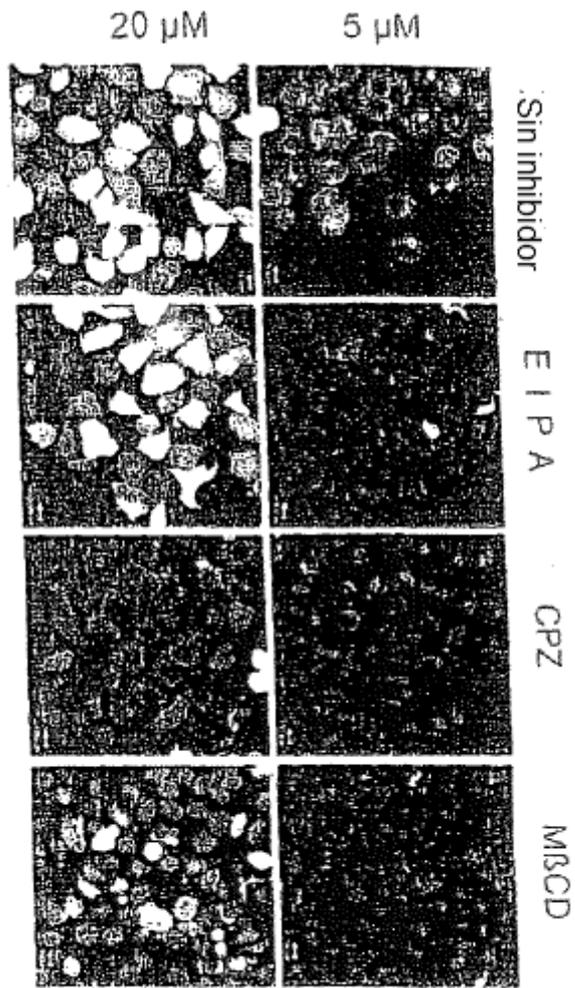


Figura 4

