

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 312**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04769334 .6**
- 96 Fecha de presentación: **13.08.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1654285**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.2006**

54 Título: **Secuencias de aminoácidos que facilitan la penetración de una sustancia de interés dentro de las células y/o los núcleos celulares**

30 Prioridad:
14.08.2003 EP 03292030
14.08.2003 FR 0309962

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2012

73 Titular/es:
Collectis
8, rue de la Croix Jarry
75013 Paris, FR

72 Inventor/es:
AVRAMEAS, Alexandre

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 378 312 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

Secuencias de aminoácidos que facilitan la penetración de una sustancia de interés dentro de las células y/o los núcleos celulares

Campo de la Invención

5 La invención se relaciona con el campo de la composición para el suministro de la sustancia activa dentro de las células y/o núcleos celulares. Más particularmente la invención describe secuencias de aminoácidos que tienen la capacidad de facilitar la penetración de una sustancia de interés tal como un fármaco dentro de los núcleos celulares.

Antecedentes

10 Subsiste a necesidad de una composición y método capaz de transferir la sustancias de interés desde el medio externo al interior de las células, y más específicamente los núcleos celulares. Tal composición y método son útiles para mejorar el suministro de fármacos dentro del citoplasma y/o los núcleos celulares del organismo anfitrión que se va a tratar. Una aplicación importante de tal composición y método se relaciona con el campo de terapia génica cuando son necesarios vectores no tóxicos y selectivos para introducir el ADN dentro de la célula y más específicamente los núcleos celulares.

15 Se han propuesto péptidos y secuencias de aminoácidos para transferir las sustancias de interés desde el medio externo hasta el interior de las células. Por ejemplo, la solicitud de patente PCT publicada bajo No. WO 01/64738, describe las secuencias de aminoácidos que reaccionan con aminoglicanos y transferencia de un amplio rango de las sustancia activas (biológicas, farmacéuticas, cosméticas, nutricionales, diagnósticas o de seguimiento) tal como ácidos nucleicos, proteínas, fármacos, antígenos o anticuerpos.

Resumen de la Invención

25 Se han encontrado ahora nuevas secuencias de aminoácidos que se pueden utilizar in vivo e in vitro como agentes para internalizar las sustancias de interés dentro de las células. Por lo tanto la presente invención se relaciona con una secuencia de aminoácidos que es capaz de facilitar la penetración de una sustancia de interés seleccionada del grupo que comprende ácido nucleico, proteína, fármaco, antígeno, anticuerpo, polímero y marcador tal como fluorocromo dentro de los núcleos celulares y tiene la siguiente fórmula:



En donde

X₁ es una secuencia de aminoácidos de 1 a 20 aminoácidos;

30 p es un número completo entre 0 y 5;

B es un aminoácido básico;

X es un aminoácido no básico, preferiblemente hidrófobo, tal como alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina o tirosina.

35 De manera general, la secuencia de aminoácidos de la fórmula (III) que tiene menos de 100 aminoácidos, menos de 50 aminoácidos se considera mejor, y menos de 25 aminoácidos todavía mejor.

Ventajosamente, las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención tienen entre 18 y 25 aminoácidos.

De manera general, la secuencia de aminoácidos incluye un alto número de aminoácidos básicos (B) tal como lisina, arginina o histidina.

"alto número" se debe entender como por lo menos igual a 3.

40 Las secuencias de aminoácidos preferidas de acuerdo con la invención son aquellas en donde:

- p es 0, y/o

- X₁ es una secuencia de 2 a 5 aminoácidos, y/o

En otra realización, diversos o todos los L-aminoácidos de la secuencia de aminoácidos anterior se pueden cambiar a los Aminoácidos D. En cierta realización preferida, el aminoácido de terminal N y/o de terminal C es un Aminoácido D.

5 Particularmente una secuencia de aminoácidos de interés de acuerdo con la fórmula anterior son:

DPV15b: Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.2).

La presente invención se relaciona adicionalmente con las siguientes secuencias de aminoácidos que se pueden utilizar in vivo e in vitro como agentes para internalizar las sustancias de interés dentro de las células:

10 DPV3: NH₂-R K K R R R E S R K K R R R E S-COOH

DPV3/10: NH₂-R K K R R R E S R R A R R S P R H L-COOH

DPV6: NH₂-G R P R E S G K K R K R K R L K P-COOH

DPV7: NH₂-G K R K K K G K L G K K R D P-COOH

DPV7b NH₂-G K R K K K G K L G K K R P R S R-COOH

15 DPV10: NH₂-S R R A R R S P R H L G S G-COOH

DPV10/6: NH₂-S R R A R R S P R E S G K K R K R K R-COOH

Respectivamente la SEQ ID No 4, 5, 6, 8, 9, 3, 7.

La invención se relaciona con estas secuencias con o sin las Cisteínas del terminal C. Se puede agregar cisteína en la posición del terminal C o N de las secuencias para conjugar los péptidos con las moléculas.

20 Por lo tanto la presente invención se relaciona con el DPV anterior que puede facilitar la penetración de una sustancia de interés dentro de los núcleos celulares. La definición y descripción detallada aquí adelante están dirigidas a DPV15, DPV15b y DPV3, 3/10, 6, 7, 7b, 10, 10/6.

Definiciones y descripción detallada de la invención

25 Las secuencias de aminoácidos anteriores son capaces de reaccionar in vivo con los aminoglicanos o glicoaminoglicanos y más particularmente con heparina, sulfatos de condroitina y sus derivados.

30 El mecanismo para internalización del péptido (secuencia de aminoácidos) de acuerdo con la invención, y por lo tanto de las sustancias de interés acopladas a dicho péptido, es por lo tanto dependiente de la energía. La vectorización que utiliza los péptidos anteriores es por lo tanto destacada por el hecho que no viene de un sistema pasivo. En consecuencia las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención se caracterizan por su capacidad de cruzar la membrana celular y reaccionar in vivo con los aminoglicanos, los glicoaminoglicanos, los sulfatos aminoglicano, las condroitinas y los sulfatos de condroitina.

35 Los péptidos de acuerdo con la invención son por lo tanto destacados porque tienen la capacidad de cruzar las membranas celulares mediante un mecanismo activo, luego alojarse en el citoplasma y/o los núcleos celulares y así para hacer posible tener un vector cuyo uso no se limita, cuando se pasa dentro de la célula, por el tamaño de las sustancias que se van a transportar. De hecho, los vectores (constituidos por o que comprenden el péptido/aminoácido) de acuerdo con la invención son capaces de transportar los fármacos, que varían de moléculas químicas pequeñas (bajo peso molecular) a proteínas o ácidos nucleicos tipo plásmido (alto peso molecular).

40 El uso de estos vectores que abre una nueva ruta en la terapia de proteína intracelular o terapia génica. Esta capacidad especial de los vectores en la invención para penetración la hace posible para los fármacos objetivo en las células en una forma preferencial, contribuyendo así a una reducción potencial en la toxicidad de los fármacos y un aumento potencial en el índice de eficacia.

"Derivados de heparina o de sulfato de condroitina" o "aminoglicanos como heparina o sulfato de condroitina" se entiende que significan cualquier producto o sub-producto como se define en la técnica anterior (Cardin A.D. & Weintraub H.J.R. Arteriosclerosis 9:21 (1989); Merton B. et al. Annu. Rev. Cell Biol. 8:365 (1992); David G. FASEB J. 7:1023 (1993)).

5 Se entiende que "facilitar la penetración" significa facilitar el pasaje o traslado de una sustancia desde el medio externo al medio intracelular, y muy específicamente en el citoplasma y/o el núcleo de la célula. Esta penetración se puede determinar mediante diversos procesos, por ejemplo mediante una prueba de penetración celular que tiene una primera etapa de incubación para las secuencias de aminoácidos en la presencia de las células cultivadas, seguido por una etapa de fijación y permeabilización de aquellas células, y luego revelación de la presencia de dicha
10 secuencia de aminoácidos dentro de la célula. La etapa de revelación se puede hacer con otra incubación en la presencia de los anticuerpos marcados y dirigidos contra dicha secuencia, seguida por detección en el citoplasma o en proximidad inmediata de los núcleos celulares, o aún dentro de estos, de la reacción inmunológica entre la secuencia y los anticuerpos marcados. También se puede hacer revelación al hacer una secuencia de aminoácidos en la invención y detectar la presencia de dicha marca en los compartimientos celulares. Se describe una prueba de
15 penetración celular en la solicitud de patente No. WO 97/02840.

Se entiende que "sustancia de interés" significa cualquier producto que presenta una sustancia de interés, particularmente biológica, farmacéutica, diagnóstica, de seguimiento, o agro-alimento. Estas pueden tener ácidos nucleicos (ADN, ARN, siARN, dsARN, SsARN, aARN) que pueden tener diversos orígenes, y particularmente,
20 humanos, víricos, animales, eucarióticos o procarióticos, vegetales, sintéticos, etc., y son capaces de variar en tamaño, que varían desde oligonucleótido simple hasta un genoma o fragmento de genoma. También puede ser un genoma vírico o plásmido. La sustancia también puede ser una proteína, tal como una enzima, una hormona, una citoquina, una apolipoproteína, un factor de crecimiento, un antígeno, un anticuerpo, etc. Esta también puede ser una toxina, antibiótico, molécula antivírica o modulador inmune. Esta también puede ser un componente tipo polímero, tal como una microesfera o una nanoesfera.

25 De manera general, la sustancia de interés puede ser cualquier ingrediente activo de un fármaco, si este es un producto químico, bioquímico, natural o sintético. Las moléculas pueden ser pequeñas, con un peso molecular de cerca de 500D, o grandes como proteínas de cientos miles de Daltons. Pero el ingrediente activo también puede ser un marcador tal como un fluorocromo por ejemplo Tetra- Metil-Rodamina (TMR).

30 La sustancia de interés puede ser directamente activa o se puede activar in situ por un agente distinto o mediante condiciones ambientales. El alcance de la invención se extiende a combinaciones de la secuencia de aminoácidos con una sustancia de interés como se definió anteriormente.

Otro tipo preferido de secuencias de acuerdo con la invención se constituye por i) una primera secuencia de aminoácidos como se definió anteriormente y ii) una segunda secuencia de aminoácidos que corresponde a un fragmento de anticuerpo.

35 En esta realización, la primera secuencia de aminoácidos se acopla (se liga directamente o indirectamente) a la segunda secuencia de aminoácidos.

La segunda secuencia de aminoácidos (péptido) se deriva ventajosamente de la parte variable de los anticuerpos anti-ADN humanos.

40 El acoplamiento de las secuencias de aminoácidos y péptidos derivados de las partes variables de los anticuerpos anti-ADN humanos dentro de una y la misma molécula resulta en la preparación de un vector de péptido que es particularmente efectivo en el traslado y transferencia intracelular de las sustancias de interés.

Esta combinación también proporciona un aumento de traslado y transferencia del vector especialmente adaptado para uso en humanos. De hecho, como se indicó anteriormente, aunque los vectores de péptido de origen murino conocido de la WO 97/02840 se codifican por la línea germinal y no lleva mutaciones, y posteriormente se debe
45 cerrar a aquellos encontrados en humanos en términos de antígenos, es posible que su inyección en los humanos induzca una reacción inmune. El vector de péptido formado de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención y de péptidos derivados de anticuerpos anti-ADN evita este problema.

Las características generales de estos péptidos derivados de anticuerpos anti-ADN humanos son cercanas a aquellas de los péptidos de origen murino descritos en la solicitud de patente WO 99/07414, mientras que tienen
50 propiedades adicionales que se distinguen del último, a saber:

1) Para penetrar dentro de las células, estos tienen que tener un metabolismo celular activo (temperatura de cultivo entre 25° C y 39° C, preferiblemente y 37° C), mientras que los péptidos de murino son claramente menos dependientes;

2) Estos reaccionan mucho menos fuertemente con ADN que los vectores de murino;

5 3) Su capacidad de penetración no se ve influenciada significativamente por las moléculas que se van a transportar dentro de la célula;

4) Estos penetran mejor dentro de las células de origen humano que dentro de las células de otros orígenes.

10 Las secuencias de aminoácidos (péptidos) como se definió anteriormente son capaces de transportar dentro de las moléculas de las células que se combinan con estas covalentemente o no covalentemente, y así son vectores efectivos para la transferencia intracelular de las sustancias de interés.

Como se muestra en el ejemplo con relación a la internalización de DPV-antiPO IgG (ver figuras 18 y 42), los péptidos de acuerdo con la invención son capaces de transportar dentro de las células moléculas capaces de transportar dentro de las moléculas de células que permanecen activas dentro de las células.

15 Por lo tanto, la presente invención se dirige a la utilización de las secuencias de aminoácidos definidas anteriormente para preparar las composiciones designadas para transferir sustancias de interés dentro de las células. Esta capacidad de los péptidos en la invención es una ventaja para permitir el transporte de la sustancia activa a través de las membranas biológicas y, muy específicamente, a través de las barreras hematoencefálicas, hemoretinal, intestinal y pulmonar. Los péptidos en la invención tienen el interés de ser capaces de ser utilizados en formas de administración ajustada a las sustancias activas a las que se acoplan y al tipo de célula objetivo, particularmente aquellas que requieren el paso a través de las barreras anteriores.

20 En otra realización, la presente invención se relaciona con el uso de dichas secuencias de aminoácidos como un péptido vector. Estos vectores, debido a las propiedades de dichas secuencias de aminoácidos, se pueden utilizar fácilmente para transferencia intracitoplásmica, intracitosólica y /o intranuclear en los humanos, sin riesgo para ellos o cualquier degradación de la sustancia de interés acoplada al vector.

25 Un vector de acuerdo con la presente invención se caracteriza por el hecho que se compone de, o incluye, una secuencia de aminoácidos como se definió anteriormente.

30 Como se indicó anteriormente, un vector también puede comprender uno o más fragmentos de anticuerpo, preferiblemente polirreactivos, y más específicamente uno o más fragmentos que vienen de las regiones hipervariables del anticuerpo, ligados a una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el vector que es el objeto de de la invención se caracteriza por el hecho que contiene un fragmento de la cadena pesada de un anticuerpo.

El objeto de la presente invención es un vector para internalización celular, caracterizado por el hecho que contiene una o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención y uno o más fragmentos de un IgM o un IgG.

35 Preferiblemente, dicho vector contiene toda o parte de la región CDR2 de un anticuerpo. Como una variación, dicho vector contiene toda o parte de la región CDR3 de un anticuerpo. Más específicamente, dicho vector contiene por lo menos una región CDR3 de un anticuerpo humano de anti-ADN, seleccionada del grupo que consiste de RTT79, NE-1 y RT72.

En otra realización, el vector también puede contener toda o parte de la región CDR2, y toda o parte de la región CDR3.

40 "Todo o parte" se entiende que el vector puede contener la región CDR completa relacionada, o solo parte de esta, dado que el vector retiene la capacidad de penetrar dentro de las células (homólogo funcional). "Parte de la región CDR" se entiende una región CDR derivada de uno o más aminoácidos terminales. Esta también puede ser una región de CDR en la que uno o más residuos internos se han eliminado o sustituido por otros aminoácidos, preferiblemente aminoácidos de la misma naturaleza (aminoácidos básicos, por ejemplo).

45 Como se indicó anteriormente, el vector en la invención es particularmente bien adecuado para el transporte intracelular y intranuclear y la transferencia de las sustancias de interés.

La presente invención por lo tanto se dirige al suministro de un vector tal como aquel descrito anteriormente, caracterizado por el hecho que contiene una sustancia que se puede incorporar dentro de las células y/o los núcleos de dichas células.

5 Más específicamente, la presente invención está dirigida a un vector cuya capacidad de penetración es muy independiente de la naturaleza de la sustancia de interés que se acopla a esta. Esta característica, propio a estos vectores humanos comparado con los vectores de murino, es de interés principal en el uso planeado de estos vectores. Pero la invención también se interesa en los vectores que se adaptan a la sustancia de interés que se acopla a estos.

10 "Acoplamiento" se entiende que significa cualquier tipo de interacción que permite la asociación física entre la sustancia de interés y el vector. Este puede ser divisible o no divisible de acuerdo con el medio biológico y/o la sustancia de interés transportado por los péptidos de la invención o puede ser divisible por medios físicos aplicados al organismo a los que se ha administrado el vector acoplado a la sustancia activa. Así, la expresión del efecto biológico de la sustancia puede requerir que se libere del vector. Se puede mencionar doxorubicina como un ejemplo de una sustancia de interés que se libera preferiblemente del vector.

15 Sin embargo, la interacción puede ser suficientemente sólida que el vector no disocia antes o durante la penetración celular. Por esta razón, el acoplamiento preferido en la invención es acoplamiento covalente, aunque puede ser acoplamiento no covalente. La sustancia de interés se puede acoplar directamente al péptido en uno de aquellos extremos terminales (extremo del terminal C o N) o en una cadena lateral o una de los aminoácidos. La sustancia de interés también se puede acoplar indirectamente al conectar un brazo a uno de los extremos terminales de los péptidos o a una cadena lateral de aminoácidos. Para facilitar el acoplamiento covalente se puede agregar un residuo cisteína a la secuencia de aminoácidos en uno de aquellos extremos terminales o en cualquier posición de dicha secuencia de aminoácidos.

25 El acoplamiento se puede hacer mediante cualquier proceso de acoplamiento químico, bioquímico, enzimático o genético conocido por una persona experta en la técnica, pero de manera general se prefiere utilizar un reactivo de puenteado homofuncional o heterofuncional similar a succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC). Otros medios de acoplamiento que se pueden mencionar son aquellos seleccionados de entre: agentes bifuncionales o multi-funcionales que contienen grupos alquilo, arilo, aralquilo o péptido; ésteres; aldehídos o alquilo, arilo o ácidos aralquilo; anhídrido, grupos sulfhidrilo o carboxilo tal como ácido maleimil benzoico y derivados de ácido maleimil propiónico y derivados succinimidilo; grupos derivados de bromuro o cloruro cianogénico, carbonildiimidazola, ésteres succinimida o halogenuros sulfónicos.

35 En otra forma de la realización de esta invención, dicha sustancia de interés también se puede acoplar mediante cualquier técnica de ingeniería genética conocida por un experto en la técnica. "Ingeniería genética" significa utilizar un vector de expresión en el que el ADN que codifica vectores de péptido se clona en la fase en 5' y/o 3' del ADN complementario del gen de interés. La expresión de la proteína de fusión es bajo el control de un promotor. El sistema de expresión se puede utilizar en una célula eucariótica y procariótica para la producción de la proteína de fusión.

En una primera realización, dicha sustancia de interés se acopla en el extremo del terminal N de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención. En una segunda realización, dicha sustancia de interés se acopla al extremo del terminal C de dicha secuencia.

40 De forma sorprendente, se ha mostrado que el vector de acuerdo con la presente invención es capaz de potenciar la actividad biológica y, potencialmente, reducir la toxicidad de dicha sustancia acoplada. Más particularmente, el uso del vector ofrece la posibilidad de superar la resistencia del fármaco desarrollado por un sujeto contra una sustancia activa tal como una molécula anti-neoplásica.

45 Esta invención por lo tanto también tiene su objeto al vector caracterizado por el hecho que llega a ser posible aumentar la actividad biológica de la sustancia de interés a la que se acopla.

También se ha mostrado que el vector que es el objeto de la invención permite la transfección de las células in vitro.

50 En una realización particular de la invención, el vector se acopla a la sustancia de interés mediante por lo menos una molécula, llamada una "molécula de anclaje", que tiene una fuerte afinidad natural para la sustancia de interés que se va a internalizar. La afinidad natural de la molécula de anclaje para la sustancia de interés le permite al transportador interactuar no covalentemente con dicha sustancia de interés, y por lo tanto lo lleva en el viaje intracelular.

Otra ventaja especialmente interesante de este tipo de transportador consiste en el hecho que, debido a la afinidad natural de la molécula de anclaje para la sustancia de interés, estos dos elementos se acoplan en una forma totalmente natural, sin interacción química o bioquímica.

5 Este tipo de transportador es particularmente interesante en un caso en donde la sustancia de interés, debido a su tamaño y/o su estructura, prueba ser difícil de acoplar directamente a la secuencia de aminoácidos. Este tipo de transportador también puede probar ser particularmente útil cuando la sustancia de interés no es muy estable, y cuando cualquier tipo de interacción química para acoplamiento puede degradarla o alterar su actividad.

Adicionalmente, el transportador no puede ser específico para una única sustancia de interés, pero puede, por el contrario, permitir la interiorización de diversas sustancias diferentes dentro de las células y/o los núcleos celulares.

10 La presente invención también se relaciona con células eucarióticas, que excluye células embrionarias humanas, que contienen una secuencia de aminoácidos como se definió anteriormente. También se relaciona con células eucarióticas que contienen una secuencia de aminoácidos o un vector de acuerdo con la invención. También se relaciona con cualquier tipo de célula eucariótica, que excluye células embrionarias humanas, que se han transfectado por un vector de acuerdo con esta invención.

15 La invención también se relaciona con un proceso para transferir una sustancia de interés dentro de una célula in vitro y para aumentar la actividad biológica de dichas sustancias de interés que tiene las siguientes etapas:

a) acoplar la sustancia a una secuencia de aminoácidos, a un vector o a un transportador de acuerdo con la invención, como se describió anteriormente, y

20 b) incubar la célula con dicho producto de acoplamiento en una temperatura de cultivo que permite el metabolismo activo de dicha célula.

Tal temperatura está entre 25° C y 39° C, preferiblemente 37° C.

25 Esta invención también está dirigida a una composición que tiene como ingrediente activo secuencias de aminoácidos, vectores "cargados" con por lo menos una sustancia de interés, o células eucarióticas que se han transfectado de acuerdo con la invención. Su objeto es también el uso de tales composiciones para la formulación y preparación de los productos biológicos, farmacéuticos, cosméticos y agro-alimenticios.

El término "carga" se refiere, como se indicó anteriormente, a una secuencia de aminoácidos o vector de acuerdo con la invención, ligado directamente o indirectamente, o conjugado con por lo menos una sustancia de interés.

30 El alcance de la invención se extiende a sales de adición ácida o alcalina farmacéuticamente aceptables, hidratos, ésteres, solvatos, precursores, metabolitos o estereoisómeros, de dichos vectores cargados con por lo menos una sustancia de interés. El alcance de la invención también se extiende a formulaciones farmacéuticas que tiene un vector o transportador cargado con por lo menos una sustancia de interés en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales no tóxicas de las secuencias de aminoácidos en la invención que de manera general se pueden preparar al tener la base libre que reacciona con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Estas sales retienen su eficacia biológica y las propiedades de las bases libres. Ejemplos representativos de dichas sales que se pueden mencionar son sales solubles en agua e insolubles en agua, tal como acetatos, ansonatos (4,4-diaminostilbenos-2,2'- disulfonatos), benceno sulfonatos, benzonatos, bicarbonatos, bisulfatos, bitartratos, boratos, bromuros, butiratos, edetatos de calcio, camsilatos, carbonatos, cloruros, citratos, clavulatos, diclorohidratos, edetatos, edisilatos, estolatos, esilatos, fumaratos, gluceptatos, gluconatos, glutamatos, glicolilarsanilatos, hexafluorofosfatos, hexilresorcinatos, hidrabaminas, bromhidratos, clorhidratos, hidroxinaftoatos, yoduros, isotionatos, lactatos, lactobionatos, lauratos, malatos, maleatos, mandelatos, mesilatos, metil bromuros, metil nitratos, metil sulfatos, mucatos, napsilatos, nitratos, 3-hidroxi-2-naftoatos, oleatos, oxalatos, palmitatos, pamoatos (1,1-metileno-bis-2- hidroxi-3-naftoatos, emboatos), pantotenatos, fosfatos/difosfatos, picratos, poligalacturonatos, propionatos, p-tolueno sulfonatos, salicilatos, estearatos, subacetatos, succinatos, sulfatos, sulfosalicilatos, suramatos, tannatos, tartratos, teoclatos, tosilatos, trietodidas, valeratos y sales de N-metilglucamina amonio.

45 Se puede tratar un sujeto con una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido o un vector de acuerdo con la invención, cargado con por lo menos una sustancia de interés. La expresión "cantidad farmacéuticamente efectiva" significa una cantidad capaz de hacer la sustancia de interés que penetra suficientemente para inducir la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano como se espera por el investigador o médico que atiende.

5 La invención también cubre composiciones farmacéuticas adecuadas para la introducción de una sustancia de interés dentro de una célula o núcleo celular. Las composiciones contienen una cantidad efectiva de una secuencia de aminoácidos, un vector o un transportador de acuerdo con la invención, "cargado" con por lo menos una sustancia de interés, solo o en combinación con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones son particularmente útiles en el sentido que tienen muy baja toxicidad, o no son tóxicas.

10 Los vectores de acuerdo con la invención, o sus sales, "cargadas" con por lo menos una sustancia de interés, se pueden administrar mediante cualesquier rutas de administración aceptadas por los agentes terapéuticos. Estos procesos incluyen la administración sistémica, por ejemplo administración oral, nasal, parenteral o tópica, por ejemplo administración transdérmica o aún central, por ejemplo mediante la ruta quirúrgica intracraneal o administración intraocular.

Se puede utilizar la administración oral por medio de comprimidos, cápsulas de gel, cápsulas blandas (que incluyen formulaciones de liberación retrasada o de liberación extendida), píldoras, polvos, gránulos, elíxires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Esta forma de presentación es particularmente adecuada para el paso a través de la barrera intestinal.

15 La administración parenteral se hace de manera general mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa o mediante perfusión. Las composiciones inyectables se pueden preparar en formas tradicionales, en suspensión o solución líquida o en forma sólida para disolución extemporánea en un líquido. Esta forma de presentación se adapta más específicamente para el paso a través de la barrera hematoencefálica.

20 Se mantiene una posibilidad de administración parenteral que utiliza el implante de un sistema de liberación lenta o extendida que hace seguro un nivel de dosificación constante, por ejemplo de acuerdo con la US-A-3 710 795.

Para la administración intranasal, se pueden utilizar vehículos intranasales adecuados.

Para la administración transdérmica, se pueden utilizar parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por un experto en la técnica. Un sistema de liberación transdérmico permite la administración continua.

Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, ungüentos, lociones, rociadores en aerosol y geles.

25 Con base en la ruta planeada de administración, los compuestos pueden venir en forma sólida, semi-sólida o líquida.

30 Para las composiciones sólidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos o gránulos en el estado libre o incluidos en cápsulas de gel, el ingrediente activo se puede combinar con: a) diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina; b) lubricantes, por ejemplo silicona, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol; c) ligadores, por ejemplo silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio y/o povidona; si es necesario, d) desintegrantes, por ejemplo, almidón, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; y/o e) absorbentes, tintes, agentes aromáticos y endulzantes. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y análogos de calidad farmacéutica.

35 Para composiciones semi-sólidas, tal como supositorios, el excipiente puede ser, por ejemplo, una emulsión o suspensión grasa, o uno con una base de polialquilenglicol, tal como polipropilenglicol.

40 Las composiciones líquidas, particularmente inyectables o aquellas que se incluyen en una cápsula blanda, se pueden preparar, por ejemplo, mediante disolución, dispersión, etc. del ingrediente activo en un solvente farmacéuticamente activo tal como, por ejemplo, agua, suero fisiológico, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, un aceite y similares.

45 La secuencia de aminoácidos o vectores de acuerdo con la invención, "cargado" con por lo menos una sustancia de interés, también se puede administrar en la forma de sistemas de liberación tipo liposoma, tal como en la forma de vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Las liposomas se pueden hacer de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearoilamina o fosfatidil colinas. En una forma de realización, se puede hidratar una película de componentes líquidos con una solución acuosa del fármaco para formar una capa de lípido que encapsula la medicación, como se describe en la US-A-5 262 564.

Esta se puede esterilizar y/o contener adyuvante y sustancias auxiliares no tóxicas, tal como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsificantes, agentes que promueven la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o reguladores. También pueden contener otras sustancias que tienen interés terapéutico. Las

composiciones se preparan, respectivamente, mediante procesos de mezcla, granulación o recubrimiento tradicionales, y contienen cerca de 0.1 % a 75 %, preferiblemente cerca de 1 % a 50 % del ingrediente activo.

Las secuencias de aminoácidos o vectores de la invención, "cargados" con por lo menos una sustancia de interés, también se pueden acoplar con polímeros solubles, tal como soportes de fármaco objetivo. Tales polímeros pueden contener povidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxi-etil-aspanamida-fenol o poli (óxido de etileno)-polilisina sustituido con residuos de palmitol. Los compuestos en esta invención también se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en la producción de liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(epsilon-caprolactona), poli(ácido hidroxibutírico), los ésteres poliorto, los poliacetales, los polidihidropiranos, los policianoacrilatos y los copolímeros de hidrogel secuenciado reticulado o anfipático.

La dosificación para la administración de las secuencias de aminoácidos o los vectores de la invención, cargada con por lo menos una sustancia de interés, se selecciona dependiendo de la diversidad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del sujeto; la gravedad de la afección que se va a tratar; la ruta de administración; el estado de las funciones del hígado o riñón del sujeto, y la naturaleza del compuesto particular o la sal utilizada. Un médico o veterinario regularmente experimentado determinará fácilmente y prescribirá la cantidad efectiva del vector cargado con la sustancia de interés con el fin de evitar, contrarrestar o detener el progreso de la afección médica que se va a tratar.

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas puede contener de 0.1 % a 99 %, preferiblemente 1 % a 70 %, del ingrediente activo.

Como ejemplos, las dosificaciones orales de las secuencias de aminoácidos o vectores de la invención, cargadas con por lo menos una sustancia de interés, cuando se utilizan para los efectos indicados, estará alrededor de 0.05 y 1,000 mg/día de la ruta oral y, preferiblemente viene en la forma de comprimidos que contienen 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 y 1,000.0 mg de ingrediente activo. Los niveles en plasma efectivos de los vectores cargados con por lo menos una sustancia de interés variarán de 0.002 mg a 50 mg por kilogramo de peso corporal y por día.

Las secuencias de aminoácidos o vectores de la invención, cargados con por lo menos una sustancia de interés, se pueden administrar en la forma de dosis diarias únicas, o se puede administrar la dosis diaria total en dos, tres o cuatro dosis por día.

La presente invención también describe un agente diagnóstico para uso in vitro, compuesto de o que contiene por lo menos una secuencia de aminoácidos, vector, y/o una célula de acuerdo con la invención. Tal agente diagnóstico también se puede utilizar in vivo.

La presente también describe un equipo diagnóstico que incluye dicho agente diagnóstico. Más específicamente, el equipo diagnóstico incluye una cantidad predeterminada de una composición de acuerdo con la invención, en uno o más contenedores.

De forma similar, la secuencia de aminoácidos en la invención, o un vector y/o un transportador que contiene qué secuencia de aminoácido, o células transfectadas con la ayuda de dicho vector, se puede utilizar in vivo para propósitos preventivos, por ejemplo infecciones, metástasis, apoptosis celular (enfermedades degenerativas, isquemia de tejido...), o para propósitos terapéuticos, por ejemplo el tratamiento de enfermedades infecciosas (víricas, bacterianas...), cáncer y neo-angiogenia patológica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra Peroxidasa de Rábano Activada de Maleimida Ligada a EZ. M.W = 40.000. R representa DPV o cisteína.

La Figura 2 muestra el ejemplo de la separación de SDS-PAGE de los conjugados DPV-PO. A: se carga 15 mg de cada conjugado DPV-HRP en 10 % de gel SDS-PAGE. B: cálculo de peso molecular para cada conjugado (software Bioprofil).

La Figura 3 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-PO en células HCT116.

La Figura 4 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-PO en células HeLa.

La Figura 5 muestra la comparación del nivel de internalización de los conjugados DPV15-PO, DPV15b-PO y DPV10-PO en células HeLa y HCT116.

- La Figura 6 muestra la ubicación de los conjugados DPV-PO en células HeLa.
- La Figura 7 muestra tñido inmunofluorescente de conjugados DPV15b-PO y DPV15-PO después de internalización en células HeLa durante 4 horas a 37° C.
- 5 La Figura 8 muestra internalización de los conjugados DPV-PO como una función de la concentración de conjugado inicial.
- La Figura 9 muestra la influencia de la temperatura en el nivel de internalización de los conjugados DPV-PO.
- La Figura 10 representa los niveles comparativos de internalización de DPV15b-PO y Cys-PO en células CHO y PgsA-745.
- La Figura 11 muestra el efecto inhibitor de heparina en la acumulación intracelular de los conjugados DPV-PO.
- 10 La Figura 12 muestra el efecto inhibitor de Poli-L-Lys en la acumulación intracelular de los conjugados DPV-PO.
- La Figura 13 muestra el ejemplo de la separación SDS-PAGE de los conjugados DPV-Anti PO IgG.
- La Figura 14 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-AntiPO IgG en células HCT116.
- La Figura 15 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-antiPO IgG en células HeLa.
- 15 La Figura 16 representa una comparación del nivel de internalización de los conjugados DPV15-antiPO, DPV15b-antiPO y DPV10- antiPO en células HeLa y HCT116.
- La Figura 17 muestra la localización de los conjugados DPV15-antiPO IgG y DPV15b-antiPO IgG en células HeLa.
- La Figura 18 muestra el tñido inmunofluorescente de los conjugados DPV15-antiPO IgG y DPV15b-antiPO IgG después de internalización en células HeLa durante 4 horas a 37° C.
- 20 La Figura 19 muestra el tñido inmunofluorescente de los conjugados DPV15b- antiPO IgG después de internalización en células HCT116 durante 4 horas a 37° C. Esto muestra la ubicación intracelular de los conjugados DPV15b-IgG en células HCT116.
- La Figura 20 muestra la penetración cuantitativa de DPV15- y DPV15b-TMR en células HeLa.
- La Figura 21 muestra la penetración cuantitativa de DPV15- y DPV15b-TMR en células HCT116.
- La Figura 22 representa una comparación del nivel de internalización de DPV-TMR en células HeLa y HCT116.
- 25 La Figura 23 muestra tñido puntiforme citoplásmico de DPV15b-TMR después de internalización en células HeLa.
- La Figura 24 muestra el tñido puntiforme citoplásmico de DPV15b-TMR después de internalización en células HCT116.
- La Figura 25 muestra la influencia de la temperatura en el nivel de internalización de los conjugados DPV15b-TMR.
- 30 La Figura 26 muestra la cuantificación de la internalización de los conjugados DPV15b-TMR en células CHO y PgsA-745.
- La Figura 27 muestra la fórmula Clorambucilo.
- La Figura 28 y 29 representa Clorambucilo conjugado a DPV15 con un enlace de éster (E) en el grupo OH.
- La Figura 30 representa la fórmula de Paclitaxel con sus sitios de reacción.
- La Figura 31 representa la fórmula DPV15-E-PTX.
- 35 La Figura 32 representa la fórmula DPV15-Amfotericina B.

La Figura 33 muestra la eficacia del conjugado DPV15-AmB en un modelo de candidiasis de murino letal luego de una única administración intravenosa.

La Figura 34 muestra la actividad hemolítica del conjugado DPV15-AmB, y moléculas relacionadas.

La Figura 35 muestra la actividad anti-neoplásica del conjugado DPV15-doxorrubicina en ratones.

5 La Figura 36 muestra la actividad anti-neoplásica del conjugado DPV15b-doxorrubicina en ratones.

La Figura 37 muestra actividad anti-neoplásica del conjugado DPV7b-doxorrubicina en ratones.

La Figura 38 muestra actividad anti-neoplásica del conjugado DPV3-RNasa A en ratones.

La Figura 39 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV 3, 6, 7, 7b, 10, 3/10 y 10/6 -PO en células HCT116.

10 La Figura 40 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV 3, 6, 7, 7b, 10, 3/10 y 10/6 -PO en células HeLa.

La Figura 41 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV 3, 6, 7, 7b, 10, 3/10 y 10/6 -antiPO IgG en células HCT116.

15 La Figura 42 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV 3, 6, 7, 7b, 10, 3/10 y 10/6 -antiPO IgG en células HeLa.

La Figura 43 muestra el nivel de internalización de los conjugados DPV 3, 6, 7, 7b, 10, 3/10 y 10/6 -TMR en células HeLa y HCT116.

Ejemplos

20 Otras ventajas y características de la invención aparecerán de los siguientes ejemplos que se refieren a las figuras anteriores. Los ejemplos se dan para ilustrar la invención pero no limita el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1 Internalización de la molécula de control sin efecto biológico (Peroxidasa).

1) Materiales y Métodos.

1.1) Naturaleza del ligando.

25 Se ha seleccionado la peroxidasa para representar la capacidad del DPV15 y DPV15b para internalizar proteínas de tamaño medio (40000 Da). El uso de una forma preactivada de la proteína permite la preparación de los conjugados homogéneos (solo 1 DPV por molécula PO). La penetración de los conjugados DPV-PO se prueba en estirpes celulares HCT116 (carcinoma colorrectal) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix).

30 - Peroxidasa de Rábano Activada de Maleimida Ligada a EZ (Pierce 31485) (Figura 1). Se utiliza Peroxidasa de Rábano de Maleimida Ligada a EZ (PO) (M.W = 40.000) para una preparación fácil de conjugados Peroxidasa. Este es un derivado PO estable y pre-activado que reacciona con grupos sulfhidrilo (-SH). Este producto se puede utilizar para conjugar PO en cualquier ligando que contiene un grupo -SH libre.

- Vectores de péptido. DPV15 :

Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.1) con un residuo cisteína en su extremo del terminal C para acoplar una sustancia de interés,

35 DPV15b : Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.2) con un residuo cisteína en su extremo del terminal N para acoplar una sustancia de interés,

DPV15 y DPV15b pueden comprender un residuo cisteína en uno o ambos extremos de terminal N o C para acoplar una sustancia de interés,

DPV10: Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg His Leu Gly Ser Gly (SEQ ID NO.3) con un residuo cisteína en su terminal C para acoplar una sustancia de interés (esta secuencia se ha descrito en la solicitud de patente PCT publicada bajo No. WO 01/64738).

5 - Vivaspina (vivascience): membrana de ultrafiltración (6 mL / umbral de corte = 10000 Daltons), utilizada para concentración y purificación de los compuestos conjugados (eliminación de exceso de reactivo).

- Peroxidasa Libre (SIGMA ref P-6782) utilizada para controles.

1.2) Protocolo de conjugación.

Disolver 500 mg de péptido DIATOS en 50 ml de regulador de conjugación (NaCl 0.5M, Fosfato de sodio 50 mM, EDTA 5 mM pH 7) .

10 Disolver 1 mg de Peroxidasa Activada con Maleimida en 200 ml de regulador de conjugación.

Agregar 43 ml de péptido DIATOS a 1 mg (200 ml) de Peroxidasa Activada con Maleimida (Relación Molar: 5 pept / PO Maleimida).

Mezclar e incubar durante 3 horas a temperatura ambiente.

Agregar 1 ml de 0.5M NaCl

15 Concentrar DPV-PO con vivaspina. Centrifugación 10-15 min, 3300 g, 20° C

Volver a llenar vivaspina con 2 ml de 0.15 M NaCl y conjugado concentrado de nuevo.

Repetir esta última etapa una vez.

Se hace un control que consiste de PO ligado a Cisteína.

1.3) Conservación de los conjugados.

20 Los conjugados DPV-PO se mantienen congelados (-20° C), diluidos en 0.15 M NaCl.

1.4) Caracterización de los compuestos conjugados.

a) SDS-PAGE.

Se cargan 15 mg de cada muestra en 10 % de acrilamida de gel SDS-PAGE.

Migración 100 V - 1 hora.

25 Teñido del gel con solución coomassie azul brillante durante 1 hora.

Desteñido durante 1 hora en H₂O / Etanol / Ácido acético (6V / 3V / 1V).

30 La Figura 2A muestra un aumento del peso molecular después de acoplamiento (la banda 1 es menor en la columna 2 que en las columnas 3 y 4). La tabla en la Figura 2B muestra el resultado del cálculo de los conjugados de peso molecular con el software bioprofil. Para cada conjugado, existe un aumento de aproximadamente 2 kDa, que corresponde al peso molecular de los DPV que se agregan a la molécula PO. La presencia de una banda única en las columnas 3 y 4 muestra que solamente la molécula en la solución es realmente el conjugado DPV-PO, y que no existe solución de PO libre.

b) Prueba ELISA en placas recubiertas con Heparina.

35 Los conjugados DPV-PO y controles (PO y Cys-PO libre) se cargan en una placa ELISA previamente cubierta con 5 mg/ml de heparina (ya que solo los compuestos conjugados se unirán y reaccionarán con el sustrato PO).

Se incuban muestras diluidas (30 ng/ml) 1 hora a 37 °C, y se lavan 5 veces en PBS que contiene 0.1 % de Tween.

ES 2 378 312 T3

Se obtiene tinción con el sustrato PO (comprimidos de Diclorhidrato de O-Fenilenediamina (OPD) (Sigma)) – píldoras de 5 mg diluidas en 10 ml de regulador de citrato-ácido cítrico 0.1 M + 100 ml de H₂O₂ al 3 %). La reacción se detiene mediante la adición de 50 ml de H₂SO₄ 2N.

Lectura O.D. a 490 nm.

- 5 Esta prueba permite la detección del conjugado en la solución, como otra verificación de los resultados mostrada en la Figura 2A. Sin embargo, esto no permite su cuantificación, posiblemente solo después del experimento descrito en II.4.c.

c) Determinación de la concentración de los compuestos conjugados en la solución.

- 10 La cuantificación de los conjugados DPV-PO en la solución se realiza después de la verificación de un acoplamiento apropiado mediante Elisa, y se basa en la actividad de la proteína PO en sí mismo, asume que no existe Peroxidasa libre en la solución.

Diluciones estándar para PO libre (de 10 ng/ml, luego diluciones).

Dilución de las muestras DPV-PO 1/160 000, luego diluciones. 50 ml de solución en un pozo de una placa Elisa de 96 pozos.

- 15 Agregar el sustrato PO (OPD).

Se detiene la reacción después de 9 min mediante la adición de 50 ml de H₂SO₄ 2N.

Se lee O.D. a 490 nm y se compara con uno obtenido para PO libre.

1.5) Protocolo de internalización.

- 20 Se realizan experimentos de internalización en estirpes celulares HCT116 (carcinoma colorrectal) y HeLa (adenocarcinoma cervical). Se evalúa inicialmente la internalización en un único punto de tiempo (4 horas).

Medio de cultivo HCT116: 5a (Gibco BRL) + 1.5 mM L-glutamina + 10 % de SVF de Mc Coy.

Medio de cultivo HeLa: DMEM (Gibco BRL) + 2 mM L-glutamina + 1 mM Na Piruvato + 10 % de SVF.

a) Ensayo cuantitativo.

- 25 Las células se siembran rutinariamente en el Día 0: 3.6.10⁴ células/cm² para células HeLa, o 7.10⁴ células/cm² para células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos (0.7 cm²/pozo). Se realizan estudios de penetración en el Día 1.

Protocolo:

Conjugados diluidos en DMEM + 10 % de FCS a 75 mg/ml.

Tomar el medio de cultivo de las células.

- 30 Se incuban conjugados durante 4 horas, 37° C, 5 % de CO₂- 100 ml/pozo (es decir 7.5 mg/pozo).

Se enjuagan células 3 veces en PBS.

Se incuban células en 100 ml de Tripsina-EDTA durante 30 min a 37° C.

Se resuspenden células en 150 ml de medio de cultivo completo. Se cuentan las células.

Se centrifugan y se enjuagan las células dos veces en PBS enfriado en hielo.

- 35 Se resuspende en 220 ml de regulador de lisado frío (0.1M Tris pH8, 0.5 % de NP40).

Se incubaba 15 min a 4° C.

ES 2 378 312 T3

Se centrifugan los lisados celulares.

Se distribuyen 100 ml por pozo en una placa de 96 pozos.

Se prepara una curva estándar de peroxidasa en regulador de lisis (de 10 ng/ml. Diluido en PBS. 10 puntos). Se cuenta la solución de prueba, para calcular el % de internalización.

- 5 Se agrega sustrato soluble de Peroxidasa (1 píldora de 5 mg de OPD (Sigma) + 10 ml de regulador de citrato-ácido cítrico 0.1 M, pH5.5 + 100 ml de 3 % de H₂O₂).

De detiene la reacción después de 9 min al agregar 50 ml de H₂SO₄ 2 N.

Se lee la absorbancia a 490 nm.

b) Evaluación cualitativa de la internalización de los conjugados DPV-PO.

- 10 Las células se siembran rutinariamente en el Día 0 en portaobjetos de vidrio labteck de 8 pozos (1 cm²), en las siguientes condiciones: 0.3 10⁵ células/pozo para células CHO (células de ovario de murino), 0.25 10⁵ células/pozo para células PgsA-745 (células de ovario de murino deficientes en la expresión de glicosaminoglicanos (GAG) y células HeLa. Siempre se realiza siembra en 250 ml de medio. Los estudios de penetración se realizan rutinariamente en el Día 1 para todas estas estirpes celulares.

- 15 Protocolo:

Se diluyen conjugados en DMEM + 10 % de SVF en la concentración apropiada.

Se toma el medio de cultivo de las células

Se incuban conjugados en las condiciones apropiadas.

Se enjuagan las células 3 veces en PBS.

- 20 Se fija en 3.7 % de PFA durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Se enjuaga en PBS a TA.

Se realiza la inmunotinción con los anticuerpos apropiados, el secundario se conjuga con un fluorocromo.

Montaje en la presencia de Dapi.

2) Resultados.

2.1) Acumulación intracelular cuantitativa.

- 25 La Figura 3 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-PO en células HCT116. Se realiza lisis celular después de 4 horas de incubación de la concentración inicial de los conjugados DPV-PO de 75 mg/ml (que corresponde a aproximadamente 1.8 mM). Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

- 30 La Tabla 1 representa cantidades netas de los conjugados DPV-PO internalizados en células HCT116. Los resultados se dan en picogramos PO / 1000 células.

Tabla 1

	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV15-PO	52	21
DPV15b-PO	82	28
Cys-PO	4	2

La Figura 4 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-PO en células HeLa. Las células se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados en una concentración inicial de 75 mg/ml. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

5 La Tabla 2 representa cantidades netas de los conjugados DPV-PO internalizados en células HeLa. Los resultados se dan en picogramos / 1000 células.

Tabla 2

	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV15-PO	12	4
DPV15b-PO	47	19
Cys-PO	1	1

La Figura 5 muestra la comparación del nivel de internalización de los conjugados DPV-PO en células HeLa y HCT116.

10 Tabla 3: Número estimado de moléculas conjugadas internalizadas en cada tipo celular (millón de moléculas de conjugado por célula) y relación de la acumulación intracelular de los conjugados DPV-PO en células HeLa versus HCT116.

Tabla 3

	Millones HeLa mol / célula	Millones HCT116 mol / célula
DPV15-PO	0,7	0,2
DPV15b-PO	1,2	0,7

15 Como se puede ver en las figuras 3-5 y tabla 1-3, el nivel de acumulación intracelular de DPV-PO es variable, como una función del DPV, y como una función de la estirpe celular.

2.2) Evaluación cualitativa de la internalización de DPV-Peroxidasa en células HeLa.

20 Se incuban conjugados DPV-PO con células HeLa cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek (4 horas de incubación de una solución 75 mg/ml en DMEM + 10 % de FCS, a 37° C). El experimento se realiza con los mismos conjugados de péptido-PO como aquellos utilizados en los experimentos cuantitativos descritos anteriormente, en las mismas condiciones exactas.

La Figura 6 muestra la ubicación de los conjugados DPV-PO en células HeLa.

25 Se incuban conjugados DPV-PO durante 4 horas en una concentración inicial de 75 mg/ml en células HeLa, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos. Se realiza revelación de Peroxidasa utilizando di-aminobenzidina, como se describe en la sección III-2. Se toman dibujos con una cámara numérica Nikon coolpix, zoom máximo, después de visualización en un microscopio Leica (20 X lentes + 0.63 X adaptador).

La Figura 6 muestra imágenes típicas las que se pueden observar después de la penetración de los conjugados en células HeLa y di-aminobenzidina (DAB) Revelación de Peroxidasa. El DPV15-PO y DPV15b-PO son siempre claramente principalmente nucleares.

30 La Figura 7 muestra detalles de las células HeLa después de internalización DPV15b-PO. Se toman dibujos en las mismas condiciones como se describió anteriormente para la Figura 6. Se obtiene alargamiento numérico después de esto.

La Figura 7 muestra más precisamente lo que se puede observar. Para DPV15b-PO, los núcleos y nucléolos se tiñen claramente y también se tiñe el citoplasma, aunque mucho más débil.

5 La Figura 7 muestra teñido inmunofluorescente de los conjugados DPV15b-PO y DPV15-PO después de internalización en células HeLa durante 4 horas a 37° C. Se incuban conjugados DPV-PO durante 4 horas en una concentración inicial de 75 mg/ml en células HeLa, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos. Se realiza revelación de peroxidasa utilizando un anticuerpo monoclonal primario contra Peroxidasa, y un anticuerpo conjugado TRITC antirratón secundario.

2.3) Influencia de la concentración inicial en el nivel de acumulación intracelular.

10 Todos los experimentos preliminares se relacionan con la internalización de los conjugados DPV-PO que se ha realizado en una concentración de conjugado inicial de 75 mg/ml. Con el fin de verificar si el mecanismo de internalización se puede saturar, se estudia la influencia de la concentración inicial del conjugado en el nivel de acumulación intracelular de los conjugados.

La internalización (Figura 8) de DPV15b-PO y DPV15-PO muestra que no se alcanza una meseta dentro del rango de concentraciones que se prueba.

15 La Figura 8 muestra internalización de los conjugados DPV-PO como una función de la concentración inicial del conjugado. Se incuban células HeLa cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek durante 24 horas durante 4 horas en la presencia de los conjugados DPV-PO en las concentraciones iniciales indicadas en la figura. Se cuantifica el PO internalizado después del tratamiento extenso con tripsina para eliminar la superficie del material unido, y posteriormente la lisis celular. Los resultados se dan en picograma PO por 1000 células.

20 Todos los experimentos posteriores se realizan con una concentración inicial de DPV-PO de 25 µg/ml.

2.4) Influencia de la temperatura en la internalización de los conjugados DPV-PO.

Con el fin de determinar si la internalización de los conjugados DPV-PO es un fenómeno dependiente de la energía, realizamos experimentos cuantitativos a 37 o 4° C.

25 La Figura 9 muestra influencia de la temperatura en el nivel de internalización de los conjugados DPV-PO. Las células HeLa cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek durante 24 horas se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados DPV-PO en una concentración inicial de 25 mg/ml, a 37 o 4° C. Se cuantifica el PO internalizado después de tratamiento extenso con tripsina para eliminar la superficie del material unido, y posteriormente la lisis celular. Los resultados se dan en picograma PO por 1000 células.

30 Como se ve en la Figura 9, la internalización de los conjugados DPV-PO se inhibe a 4° C, lo que sugiere un fenómeno de endocitosis activo.

2.5) Influencia de los glicosaminoglicanos de superficie celular (GAG) en la internalización de los conjugados DPV-PO.

35 Los DPV se originan de las proteínas de unión a heparina humana y posteriormente se unen a heparina in vitro. Con el fin de verificar que es necesaria una etapa de unión a GAG in vivo, realizamos experimentos de internalización en células CHO-K1 y PgsA-745, que es un clon de vacío CHO de xilosiltransferasa y así no produce niveles detectables de los proteoglicanos (Esko et al., 1985; Rostand y Esko, 1997).

40 La Figura 10 representa niveles comparativos de internalización de células DPV15b-PO y Cys-PO en células CHO y PgsA-745. CHO-K1 o PgsA-745 cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek durante 24 horas se incuban durante 4 horas a 37° C en la presencia de los conjugados DPV-PO en una concentración inicial de 25 mg/ml. Se cuantifica el PO internalizado después de tratamiento extenso con tripsina para eliminar la superficie del material unido, y posteriormente la lisis celular. Los resultados se dan en picograma PO por 1000 células.

45 La comparación del nivel de internalización de conjugados en células CHO-K1 y células PgsA-745 (Figura 10) muestra que la ausencia de los proteoglicanos en la superficie de las células PgsA-745 conduce a una reducción importante en el nivel de conjugados internalizados, confirmando así la unión a los GAG como una primera etapa en la internalización DPV-PO.

2.6) Inhibición de heparina de la internalización de los conjugados DPV-PO.

Con el fin de confirmar la unión de los DPV a los GAG como un requisito para la internalización de los conjugados, realizamos experimentos de internalización en la presencia de heparina en el medio de incubación. La heparina se debe unir al DPV, y evita su unión a la superficie celular y la internalización posterior.

5 La Figura 11 muestra efecto inhibitorio de heparina en la acumulación intracelular de los conjugados DPV-PO. Las células HeLa cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek durante 24 horas se preincubaban con las concentraciones indicadas de heparina durante 1 hora a 37° C. Las células luego se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados DPV-PO a 25 mg/ml en medio de cultivo celular que contiene la misma cantidad de heparina. Se cuantifica el PO internalizado después de tratamiento extenso con tripsina para eliminar la superficie del material unido, y posteriormente la lisis celular. Los resultados se dan en picograma PO por 1000 células.

10 Como se ve en la Figura 11, la incubación de los conjugados en la presencia de heparina inhibe su internalización en células HeLa, confirmando así la interacción entre los GAG y los DPV.

2.7) Inhibición de Poli-L-Lys de la internalización de los conjugados DPV-PO.

15 La inhibición de la internalización de DPV-PO en células que presentan defectos en la síntesis de glicosaminoglicano (células PgsA-745 comparado con células CHO-K1), así como también la inhibición de la internalización de los conjugados DPV en la presencia de Heparina en el medio de cultivo celular que muestra que la función de los proteoglicanos de heparan-sulfato asociados con la célula como los sitios de unión de la superficie celular para la internalización DPV extracelular.

20 Con el fin de verificar esta hipótesis, probamos la inhibición de la internalización DPV-PO en células HeLa en la presencia de Poli-L-Lisina en el medio de incubación: poli-L-Lys cargado positivamente se debe unir a las cargas negativas de la superficie celular, y evitar la unión de los DPV.

25 La Figura 12 muestra el efecto inhibitorio de Poli-L-Lys en la acumulación intracelular de los conjugados DPV-PO. Las células HeLa cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek durante 24 horas se preincubaban con las concentraciones indicadas de poli-L-Lys durante 1 hora a 37° C. Luego se incuban las células durante 4 horas en la presencia de los conjugados DPV-PO a 25 mg/ml en medio de cultivo celular que contiene la misma cantidad de poli-L-Lys. Se cuantifica el PO internalizado después de tratamiento extenso con tripsina para eliminar la superficie del material unido, y posteriormente la lisis celular. Los resultados se dan en picograma PO por 1000 células.

Como se ve en la Figura 12, existe una fuerte inhibición de la internalización DPV-PO. El IC₅₀ (concentración en la que se encuentra 50 % de la internalización máxima) se sitúa alrededor de 25 mg/ml de poli-L-Lys en células HeLa.

30 Estos experimentos muestran que un enmascaramiento de las cargas negativas que están presentes alrededor de las células es suficiente para inhibir la internalización DPV, cuando se conjuga con Peroxidasa.

Ejemplo 2 Internalización de la molécula de control sin efecto biológico (Anticuerpo anti-Peroxidasa).

1) Materiales y Métodos.

1.1) Naturaleza del ligando.

35 Se escoge la inmunoglobulina de anti-Peroxidasa (AntiPO-IgG) para representar la capacidad de DPV15 y DPV15b para internalizar proteínas de muy alto peso molecular (150 000 Da).

- Anticuerpos monoclonales anti-PO purificados de líquido de ascitis mediante cromatografía en columnas de proteína G-Sefarosa: 2 mg/ml en regulador de fosfato 0.1M pH 7.4. (origen : Diatos - TT).

- Entrecruzador: Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce)

- Vectores de péptido: DPV15, DPV15b.

40 - Vivaspina (Vivascience): membrana de ultrafiltración (umbral de corte = 10000 o 30000 daltons) para concentración y purificación de IgG y la eliminación de exceso de reactivos.

- Soluciones y reguladores:

• Fosfato 0.1 M pH 7.4 (fosfato de potasio)

- Dimetil formamida (DMF)

Regulador de conjugación: NaCl 0.5 M

Fosfato de sodio 10 mM

EDTA 5 mM

} pH 7

- 5 • NaCl 0.15 M

- NaCl 0.5 M

1.2) Protocolo de conjugación.

El método de conjugación implica cuatro etapas:

Activación de IgG con el entrecruzador (SMCC, Pierce)

- 10 Filtración de IgG activado en Conjugación de Vivaspina con el péptido DIATOS

Eliminación del péptido libre

a) Activación de SMCC de la inmunoglobulina.

- Disolver 2 mg de IgG en 1 mL de regulador de fosfato 0.1M pH 7.4

- Disolver 200 mg de SMCC en 20 mL de Dimetilformamida (DMF)

- 15 - Agregar 11.1 mL de SMCC a la solución IgG (relación: 25 SMCC / IgG)

- Mezclar e incubar durante 30-40 min a temperatura ambiente

b) Filtración del IgG activado.

- Agregar 1-2 mL de regulador de conjugación en el IgG activado, preparación y centrifuga en Vivaspina 10-15 min, 3300 g, 20° C.

- 20 - Agregar 2 mL de regulador de conjugación.

- Centrifugar de nuevo y repetir esta etapa dos veces.

c) Conjugación con el péptido.

- Disolver 600 mg del péptido DIATOS en 60 mL del regulador de conjugación.

- Agregar 54.5 mL del péptido DIATOS a IgG-SMCC (Relación: 12 pept / IgG-SMCC).

- 25 - Mezclar e incubar durante 3 horas a temperatura ambiente.

d) Eliminación del péptido no acoplado y exceso de reactivos.

- Agregar 1 mL de 0.5M NaCl en la preparación conjugada IgG.

- Concentrar IgG-SMCC-péptido en Vivaspina. Centrifugación 10-15 min, 3300 g, 20° C.

- Agregar 2 mL de 0.15 M NaCl y concentrar el conjugado de nuevo.

- 30 - Repetir esta última etapa una vez.

Se hace un control que consiste de AntiPO IgG ligado a Cisteína.

1.3) Conservación de los conjugados.

Se mantienen DPV-AntiPO IgG en alícuotas congeladas de 100 ml, diluidas en 0.15 M NaCl.

1.4) Caracterización de los compuestos conjugados.

a) SDS-PAGE.

- 5 Se cargan 12 mg de cada muestra en 10 % de acrilamida de gel SDS-PAGE.

Migración 100 V - 1h.

El teñido del gel con solución coomassie azul brillante durante 1 hora.

Destefiir durante 1 hora en H₂O / Etanol / Ácido acético (6V / 3V / 1V).

- 10 La Figura 13 muestra el ejemplo de la separación SDS-PAGE de los conjugados DPV-Anti PO IgG. Aproximadamente 12 mg de cada conjugado se carga en 10 % de gel SDS-PAGE antes de migración a 100 V, y posteriormente teñido de azul coomassie.

Línea 1: estándar de Peso Molecular

Línea 2: AntiPO IgG

Línea 3: conjugado DPV 15-AntiPO IgG.

- 15 Línea 4: conjugado DPV 15b-AntiPO IgG.

- 20 La Figura 13 muestra un aumento del peso molecular después de acoplamiento, para las cadenas ligera y pesada del IgG. La banda 25 kDa en la línea 2 (cadena ligera del IgG) es menor que las bandas en las líneas 3 y 4. La presencia de diversas bandas entre 25 y 30 kDa en las líneas 3 y 4 es una indicación de un acoplamiento heterogéneo. La banda que corresponde a la cadena pesada del IgG (banda 50 kDa en la línea 2) también es mayor en las líneas 3 y 4, lo que indica un acoplamiento del DPV en ambas cadenas del IgG.

La heterogeneidad importante de conjugación no permite la determinación exacta del número de los DPV conjugados por molécula IgG mediante análisis SDS-PAGE.

b) Prueba ELISA en placas recubiertas con Heparina.

- 25 Se cargan conjugados DPV-AntiPO y controles (AntiPO IgG y Cys-AntiPO IgG libres) en una placa ELISA recubierta previamente con 5 mg/ml de heparina (ya que solo los compuestos conjugados se unirán y reaccionarán con PO).

Las muestras se diluyen a una concentración final de 10 mg/ml en PBS-Tween. Luego se realizan diluciones posteriores.

Los conjugados se incuban en la placa durante 1 h a 37° C, y se lavan 3 veces en PBS-Tween.

- 30 El PO se incuba a 1 mg/ml durante 1 hora a 37° C en cada pozo, luego se lava 5 veces en PBS que contiene 0.1 % de Tween.

Luego se agrega sustrato PO (1 píldora de 5 mg de OPD (Sigma) + 10 ml de regulador de citrato / ácido cítrico 0.1M, pH 5.5 + 100 ml de H₂O₂ al 3%).

Se detiene la reacción con 50 ml de H₂SO₄ 2N después de 5 min.

El OD se lee a 490 nm.

- 35 Esta prueba permite la verificación de la presencia de los DPV en las moléculas IgG. No obstante, la afinidad de cada DPV para la heparina es diferente, no permite la cuantificación de los compuestos en la solución. Esta cuantificación se hace al medir OD₂₈₀, sabiendo que la unidad 1.4 OD = 1 mg/ml de conjugado.

1.5) Protocolos de Internalización.

Se realizan experimentos de internalización en las estirpes celulares HCT116 (carcinoma colorrectal) y HeLa (adenocarcinoma cervical). Se evalúa la acumulación intracelular en un único punto de tiempo (4 horas).

a) Ensayo cuantitativo.

- 5 Se siembran rutinariamente células en el Día 0: $3.6 \cdot 10^4$ células/cm² para células HeLa, o $7 \cdot 10^4$ células/cm² para células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 2 pozos (4 cm²/pozo). Se realizan estudios de penetración en el Día 1.

Protocolo:

Se diluyen los conjugados en DMEM + 10 % de SVF a 100 mg/ml.

- 10 Se toma el medio de cultivo de las células

Se incuban los conjugados durante 4 horas, 37° C, 5 % de CO₂ - 400 ml/pozo (es decir 40 pg/pozo) - 2 pozo por conjugado.

Se enjuagan las células 3 veces en PBS.

Se incuban las células en 200 ml de Tripsina-EDTA durante 30 min a 37° C.

- 15 Se resuspenden las células en 400 ml de medio de cultivo completo. Se cuentan las células.

Se centrifugan y se enjuagan las células dos veces en PBS enfriado en hielo.

Se resuspende en 220 ml de amortiguador de lisado frío (0.1M Tris pH8, 0.5 % de NP40).

Se incuba 15 min a 4°C.

Se centrifugan los lisados celulares.

- 20 Se distribuyen los lisados celulares en una placa de 96 pozos que se ha cubierto previamente con IgG anti-ratón (dos veces 100 ml). Se prepara una curva estándar para antiPO IgG de 10 ng/ml.

Se diluyen los lisados celulares _ en PBS-Tween y se prepara una curva estándar para anti PO IgG a 10 ng/ml.

Se incuba 1 h a 37° C, y durante la noche a 4° C.

Se enjuaga tres veces en PBS-Tween.

- 25 Se incuba Peroxidasa 1 mg/ml en PBS-Tween, durante 1h a 37° C.

Se enjuaga tres veces en PBS-Tween.

Se agrega sustrato de Peroxidasa (1 píldora de OPD + 10 ml de regulador de citrato-ácido cítrico 0.1 M, pH 5.5 + 100 ml de 3 % de H₂O₂).

Se detiene la reacción después de 9 min al agregar 50 ml de H₂SO₄ 2 N.

- 30 Se lee la absorbancia a 490 nm y se compara con los valores de la curva estándar.

b) Evaluación cualitativa de la internalización de conjugados DPV-antiPO IgG.

- Teñido del sustrato de PO-Peroxidasa.

- 35 Las células se siembran rutinariamente en el Día 0: $3.6 \cdot 10^4$ células/cm² para las células HeLa, o $7 \cdot 10^4$ células/cm² para las células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos (0.7 cm²/pozo). Se realizan estudios de penetración en el Día 1.

ES 2 378 312 T3

Protocolo:

Se diluyen conjugados en medio de cultivo completo a 100 mg/ml.

Se toma el medio de cultivo de las células.

Se incuban los conjugados durante 4 horas, 37° C, 5 % de CO₂ - 100 ml/pozo (es decir 10 mg/pozo).

5 Se enjuagan las células 3 veces en PBS.

Se fija en Etanol frío durante 5 min a -20° C.

Se enjuaga en PBS a TA.

Se agrega PO (10 mg/ml en medio de cultivo completo) 1 h a temperatura ambiente.

Se enjuaga tres veces en PBS.

10 Se agrega sustrato de Peroxidasa (di-aminobenzidina, 1 comprimido en 10 ml de H₂O + 330 ml de H₂O₂ al 3 %).

Se enjuaga 3X en PBS.

Se toman dibujos de tñido de IgG anti-ratón conjugado con TRITC.

15 Las células se siembran rutinariamente en el Día 0: 3.6. 10⁴ células/cm² para células HeLa, o 7.10⁴ células/cm² para células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos (0.7 cm²/pozo). Se realizan estudios de penetración en el Día 1.

Protocolo:

Se diluyen conjugados en medio de cultivo completo a 100 mg/ml.

Se toma el medio de cultivo de las células.

Se incuban los conjugados durante 4 horas, 37° C, 5 % de CO₂ - 100 ml/pozo (es decir 10 mg/pozo).

20 Se enjuagan las células 3 veces en PBS.

Se fija en Metanol/Acetona fría (1/1) durante 5 min a -20° C.

Se enjuaga en PBS a TA.

Se bloque en PBS + 5 % de suero Donkey (sol A) durante 30 min a TA.

Se incuba con antirratón conjugado con TRITC 7 mg/ml en sol. A - 30 min ie la oscuridad a TA.

25 Se enjuaga en sol A, luego en PBS. [

Se equilibra en regulador de equilibrio, y se monta en el equipo Antifade Slow Fade Light con DAPI (sondas moleculares S- 24636).

2) Resultados.

2.1) Penetración cuantitativa.

30 La Figura 14 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-AntiPO IgG en células HCT116. Se realiza lisis celular después de 4 horas de incubación en una concentración inicial de los conjugados DPV-AntiPO IgG de 100 mg/ml. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

La Tabla 4 representa las cantidades netas de los conjugados DPV-antiPO IgG internalizados en células HCT116. Los resultados se dan en picogramos PO / 1000 células, como la media de tres experimentos independientes.

Tabla 4

	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV15-aPO	15,2	8,9
DPV15b-aPO	21,4	6,4
Cys-aPO	1,1	0,9

5 La Figura 15 muestra la penetración cuantitativa de los conjugados DPV-antiPO IgG en células HeLa. Las células se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados en una concentración inicial de 100 mg/ml. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

10 La Tabla 5 representa las cantidades netas de los conjugados DPV-antiPO internalizados en células HeLa. Los resultados se dan como el valor medio de tres experimentos independientes, en picogramos PO / 1000 células.

Tabla 5

	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV15-aPO	21,5	3,4
DPV15b-aPO	55,5	17,6
Cys-aPO	1,7	2,2

La Figura 16 representa una comparación del nivel de internalización de los conjugados DPV-antiPO en células HeLa y células HCT116. El nivel de internalización depende de ambas estirpes celulares, y en el DPV.

15 La Tabla 6 representa el número de moléculas conjugadas internalizadas en cada tipo celular (millón de moléculas conjugadas por célula).

Tabla 6

	Millones HeLa mol /célula	Millones HCT116 mol / célula
DPV15-aPO	0,09	0,06
DPV15b-aPO	0,22	0,08

2.2) Evaluación cualitativa de la internalización de los DPV-antiPO IgG.

20 Los conjugados DPV-antiPO se incuban con células HeLa cultivadas en portaobjetos de vidrio labtek (4 horas de incubación de una solución de 100 mg/ml en medio de cultivo celular, a 37° C). El experimento se realiza con los mismos conjugados de péptido-AntiPO IgG como aquellos utilizados en los experimentos cuantitativos descritos anteriormente.

25 Como se muestra en las figuras 17 a 18, en células HeLa, la ubicación intracelular de los conjugados PV15b- y DPV15-antiPO IgG se ubica principalmente en el núcleo de las células (teñido débil del citoplasma, que corresponde

parcialmente a la cantidad de conjugados aún en tránsito entre la membrana y el núcleo de las células, y parcialmente a la proporción del conjugado cuya localización final sería citoplásmica).

5 La Figura 17 muestra la ubicación de los conjugados DPV15-antiPO IgG y DPV15b-antiPO IgG en células HeLa. Los conjugados DPVantiPO IgG se incuban durante 4 horas en una concentración inicial de 100 mg/ml en células HeLa, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos. La revelación del conjugado se realiza utilizando Peroxidasa visualizada por su sustrato: di-aminobenzidina. Se toman dibujos con una cámara numérica Nikon coolpix, máximo zoom, después de visualización en un microscopio Leica (20 X lentes + 0.63 X adaptador). El hecho que el DPV-antiPO IgG aún reconoce el antígeno (a saber Peroxidasa) muestra que este IgG aún es activo una vez acoplado al DPV e internalizado dentro de la célula.

10 La Figura 18 muestra detalles de células HeLa después de la internalización de DPV15b-antiPO IgG y DPV15-antiPO. La internalización de los conjugados y la adquisición de la imagen se realizan en las mismas condiciones como para la Figura 17. Se realiza alargamiento en una segunda etapa.

15 La Figura 18 muestra teñido inmunofluorescente de los conjugados DPV15-antiPO IgG y DPV15b-antiPO IgG después de la internalización en células HeLa durante 4 horas a 37° C. Los conjugados DPV-antiPO IgG se incuban durante 4 horas en una concentración inicial de 100 mg/ml en células HeLa, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos. Se realiza la revelación de IgG utilizando un anticuerpo conjugado con TRITC antirratón.

20 La Figura 19 muestra el teñido inmunofluorescente de los conjugados DPV15b-antiPO IgG después de internalización en células HCT116 durante 4 horas a 37° C. Los conjugados DPV-antiPO IgG se incuban durante 4 horas en una concentración inicial de 100 mg/ml en células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos. Se realiza revelación del IgG utilizando un anticuerpo conjugado con TRITC anti-ratón.

La Figura 19 muestra la ubicación intracelular de conjugados DPV15b-IgG en células HCT116. La ubicación intracelular final de los dos conjugados es similar en células HeLa y células HCT116.

Ejemplo 3: Internalización de la molécula de control sin efecto biológico (Tetra-Metil-Rodamina "TMR").

1) Materiales y Métodos.

25 1.1) Naturaleza del ligando.

Se selecciona tetra-Metil-Rodamina para representar la capacidad de DPV15 y DPV15b para internalizar una molécula pequeña (500 Daltons).

Tetrametilrodamina-5-maleimida. (Molecular Probes T-6027)

1.2) Protocolo de conjugación.

30 Se disuelve 5 mg de TMR-5-maleimida en 207.7 ml de Dimetilformamida (DMF) (concentración final 50 mM).

Se disuelve 30 mg de DPV15b o 15.4 mg de DPV15 en 700 ml de DMF (concentración final 10 mM)

Se mezcla 200 ml de solución TMR y 700 ml de solución DPV y se incuba 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

Se agrega 2 ml de H₂O y 8 ml de Diclorometano (DCM).

35 Se mezcla y se centrifuga 2 minutos a 3000g.

Se toma la fase acuosa (fase superior)

Se repite la etapa 4 a 6 dos veces.

1.3) Conservación del conjugado.

Los conjugados DPV-TMR se mantienen como polvo seco a -20° C o 4° C bajo argón.

40 1.4) Protocolo de internalización.

a) Ensayo cuantitativo.

Las células se siembran rutinariamente en el Día 0: 1.10^5 células/cm² para células HeLa, o 2.10^5 células/cm² para células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 2 pozos (4 cm²/pozo). Se realizan estudios de penetración en el Día 1.

5 Protocolo:

Se diluyen conjugados en medio de cultivo completo (+10 % de SVF) a 20 mM.

Se toma el medio de cultivo de las células.

Se incuban conjugados durante 2 horas, 37° C, 5 % de CO₂ -600 ml/pozo

Se enjuaga dos veces en medio de cultivo completo y 2 veces en PBS.

10 Se incuban las células en 400 ml de Tripsina-EDTA durante 30 min a 37° C

Se resuspenden las células en 600 ml de medio de cultivo completo (+10 % de SVF).

Se cuentan las células.

Se centrifugan y se enjuagan células dos veces en PBS.

Se resuspende en 1 ml de regulador RIPA de lisado frío.

15 Se incuba 30 min a 4° C.

Se prepara una curva estándar para cisteína-TMR a 200 nM.

Se cuenta la fluorescencia en un fluorímetro BioRad, (excitación 480 nm y emisión 590 nm).

b) Evaluación cualitativa de la internalización de los conjugados DPV-TMR.

20 Las células se siembran rutinariamente en el Día 0: 1.10^5 células/cm² para células HeLa, o 2.10^5 células/cm² para células HCT116, en portaobjetos de vidrio labtek de 8 pozos (0.7 cm²/pozo). Se realizan estudios de penetración en el Día 1.

Protocolo:

Se diluyen conjugados en medio de cultivo completo (+10 % de SVF) a 20 mM.

Se toma el medio de cultivo de las células.

25 Se incuban los conjugados durante 2 horas, 37° C, 5 % de CO₂ – 100 ml/pozo.

Se enjuaga 2 veces en medio de cultivo completo y 2 veces en PBS. Se fija en 4 % de PFA 20 min a temperatura ambiente Se enjuaga tres veces en PBS

2) Resultados.

2.1) Acumulación intracelular cuantitativa.

30 La Figura 20 muestra la penetración cuantitativa de DPV15- y DPV15b-TMR en células HeLa. Se realiza lisis celular después de 2 horas de incubación a una concentración inicial de los conjugados DPV-TMR de 20 mM. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en dos experimentos independientes.

La Tabla 7 representa las cantidades netas de los conjugados DPV-TMR internalizados en células HeLa. Los resultados se dan en picogramos TMR/1000 células.

35

Tabla 7

	pg TMR/1000 células	Desviación estándar
DPV15-TMR	24	8
DPV15b-TMR	108	32
Cys-TMR	0	0

5 La Figura 21 muestra la penetración cuantitativa de DPV15- y DPV15b-TMR en células HCT116. Se realiza lisis celular después de 2 horas de incubación en una concentración inicial de los conjugados DPV-TMR de 20 mM. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en dos experimentos independientes.

La Tabla 8 representa las cantidades netas de los conjugados DPV-TMR internalizados en células HCT116. Los resultados se dan en picogramos TMR/1000 células.

Tabla 8

	pg TMR/1000 células	Desviación estándar
DPV15-TMR	15	2
DPV15b-TMR	40	8
Cys-TMR	1	1

10 La Figura 22 representa una comparación del nivel de internalización del DPV-TMR en células HeLa y células HCT116.

La Tabla 9 muestra un número estimado de moléculas conjugadas internalizadas en cada tipo de célula (millón de moléculas conjugadas por células) y relación de la acumulación intracelular de conjugados DPV-TMR en células HeLa versus células HT116.

15 Tabla 9

	HeLa Millones moléculas/célula	HCT116 Millones moléculas/célula	Relación HeLa/HCT116
DPV15-TMR	28	18	1.6
DPV15b-TMR	130	47	2.8

2.2) Evaluación cualitativa de la internalización de DPV-TMR en células HeLa.

La Figura 23 muestra el tñido puntiforme citoplásmico de DPV15b-TMR después de internalización de células HeLa. Los conjugados se incuban con células HeLa 2 horas a 37° C en una concentración inicial de 20 mM.

20 La Figura 24 muestra el tñido puntiforme citoplásmico de DPV15b-TMR después de internalización de células HCT116. Los conjugados se incuban con células HCT116 2 horas a 37° C en una concentración inicial de 20 mM. Se tñen los núcleos celulares con DAPI.

2.3) Influencia de la temperatura en la internalización de conjugados DPV15b-TMR.

La Figura 25 muestra la influencia de la temperatura en el nivel de internalización de los conjugados DPV15b-TMR. Las células HeLa se incuban 2 horas en la presencia de conjugados DPV15b-TMR en una concentración inicial de 25 mM, a 37 o 4° C. La célula luego se triptiniza antes de ser lisada en el regulador RIPA, y se cuantifica la fluorescencia. Cada valor es el resultado de tres experimentos independientes, cada uno en duplicado.

5 2.4) Influencia de los glicosaminoglicanos de célula en la internalización de los conjugados DPV-TMR.

La Figura 26 muestra la cuantificación de los conjugados DPV15b-TMR en la internalización en las células CHO-K1 y PgsA-745. La incubación toma lugar durante 2 horas a 37 °C, antes de triptinización y lisis en regulador RIPA durante 30 minutos a 4° C. Cada valor es el resultado de tres experimentos independientes.

Ejemplo 4 Actividad de la molécula activa conjugada (Clorambucil).

10 1) Naturaleza del ligando.

El clorambucil (Chl) es un inhibidor de la síntesis de ADN y ARN. Es un agente alquilante que provoca enlaces intra- o intercrossados en las moléculas de ADN. Los grupos reactivos son los dos grupos Cl. Su fórmula se da en la Figura 27.

15 La resistencia al clorambucil se ha ligado a un aumento en (i) la bomba de eflujo MRP1, y (ii) las glutatona S-transferasas (GST) que están implicadas en la detoxificación de las toxinas electrófilas (Morrow CS., 1998, J. Biol. Chem., 273:20114).

En la parte clínica, el problema principal es el riesgo de inducción de leucemias secundarias luego de terapia con clorambucil (Travis LB., 1994, J. Natl. Cancer Inst., 86:1450).

Los Vectores de Acoplamiento de Péptido (DPV) a clorambucil tiene 2 ventajas:

20 - los DPV superan al fenotipo resistente multifármaco (MDR) debido a la expresión de las bombas de eflujo de membrana tal como la P-glicoproteína (P-gp) o las proteínas de resistencia multifármaco (MRP), que pueden extrudir un amplio rango de fármacos antineoplásicos.

- los DPV aumentan la solubilidad de clorambucil en H₂O.

Por lo tanto, los conjugados DPV-clorambucil pueden ser más solubles y más activos en tumores resistentes.

25 2) Conjugación.

2.1) Materiales.

Se compara el conjugado DPV15-E-Chl con el Chl no conjugado (Fluka, Cat# 23125).

Chl no es soluble en soluciones acuosas pero se puede solubilizar en etanol.

30 Para ensayos de viabilidad, se solubiliza el Chl en etanol a 50 mM luego se diluye en medio de cultivo a 1 mM (ya que se prueba la concentración mayor en células contenidas en 2 % de etanol).

Se calcula el coeficiente de extinción molar a 258 nm para Chl: 17.900 ± 1.200

Se calcula la concentración exacta de las soluciones Chl y DPV15-E-Chl después de dilución en 1/100 en H₂O, medido de OD_{258nm} y utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{concentración molar}] = \text{OD}_{258\text{nm}} / 17.900$$

35 2.2) Protocolo de conjugación.

El clorambucil se ha conjugado con DPV15 con un enlace éster (E) en el grupo CO₂H como se muestra en las figuras 28 y 29. La conjugación se ha llevado a cabo por Laboratoire de Chimie Bioorganique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (LCBBMC) at Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP).

Los dos grupos reactivos (C1-) están libres, por lo tanto el conjugado no necesita ser dividido por ser activo.

DPV15: $\text{NH}_2\text{-L R R E R Q S R L R R E R Q S R-Cys-COOH}$ (16 + 1 aa)

Localización nuclear (DPV15-PO & DPV15-mAb anti-PO)

DPV15-E-Clorambucil: 1 tanda: 11/10/2001 70 mg (soluble en agua a ≥ 10 mg/ml), peso molecular = 2825.15

Pureza HPLC – 90 %, contenido neto del péptido = 60 % (contra-ión = TFA)

- 5 El análisis HPLC muestra que la preparación contiene 90 % de DPV15-E-Chl y 10 % de DPV15-E-Chl "modificado" con un espectro diferente de absorbancia. Esta modificación no se debe a proteólisis del enlace éster y no se debe más probablemente a inestabilidad de Chl como se describió previamente (Bosanquet AG., 1986, Cancer Chemother. Pharmacol., 18:176). Esto puede ser debido a (i) la modificación de los núcleos aromáticos de Chl o (ii) interacción de los átomos 2 C1 contenidos en Chl con moléculas de H_2O . Nosotros habríamos de realizar análisis de espectrometría de masa, con el fin de identificar este componente.

Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente y se protege de la luz, Chl (0,1 mg/ml en H_2O + 0.1 % de TFA) y DPV15-E-Chl (0.5 mg/ml en H_2O + 0.1 % de TFA) se degradan (50 % de degradación).

3) Ensayo de viabilidad.

3.1) Estirpes celulares humanas.

- 15 HCT116: carcinoma de colon humano (origen: ATCC #CCL-247)

HT29: carcinoma de colon humano, baja expresión de P-gp (origen: ATCC #HTB-38)

K562: leucemia mielogenosa crónica humana (CML) (origen: ATCC #CCL-243).

3.2) Ensayo de viabilidad.

- 20 Se realizan ensayos de viabilidad. En resumen, las células se siembran en placas de 96 pozos y se incuban con concentraciones aumentadas de fármacos (i) durante 1 hora luego las células se enjuagan y se incuban con medio fresco sin fármacos durante 48 horas, o (ii) durante 48 horas. Se realiza una prueba WST-1 (de Roche) y los valores IC_{50} (concentración de fármaco que inhibe 50 % de la viabilidad celular) se estiman de regresiones sigmoidales.

4) Eficacia In Vitro.

- 25 Se compara el conjugado DPV15-E-Chl con Chl y 5Fura no conjugado para la inhibición de la proliferación celular in vitro de carcinoma humano y células de leucemia. Calculamos los valores IC_{50} = concentración de fármaco que inhibe 50 % de viabilidad celular.

Tabla 10

Valores IC_{50} * (mM)	1h incubación + 48h			48 h de incubación		
	5FUra	Chl	DPV15 - EChl	5FUra	Chl	DPV15 - EChl
leucemia K562	nt	> 500 (n=2)	30 ± 0 (n=2)	nt	250 ± 70 (n=2)	30 ± 0 (n=2)
colon HCT116	113 ± 40 (n=3)	533 ± 251 (n=3)	43 ± 15 (n=3)	8.5 ± 7.9 (n=4)	200 ± 70 (n=2)	25 ± 7 (n=2)

(continuación)

Valores IC ₅₀ * (mM)	1h incubación + 48h			48 h de incubación		
	5FUra	Chl	DPV15 - EChl	5FUra	Chl	DPV15 - EChl
colon HT29	> 1000 (n=2)	650 ± 495 (n=2)	60 ± 0 (n=2)	725 ± 388 (n=2)	250 ± 70 (n=2)	325 ± 176# (n=2)

El Chl se solubiliza en etanol, se solubilizan DPV15-E-Chl y 5FUra en agua

*: valor medio de n experimentos independientes ± desviación estándar

nt: no probado

#: ver conclusión

5) conclusiones - discusión.

5.1) En término de solubilización.

5 Conjugación de DPV15 a Clorambucil led to al conjugado soluble en agua.

5.2) En término de eficacia en el crecimiento de células de tumor.

- en leucemia K562, el conjugado DPV15-E-Chl es mucho más eficiente que el Chl (≥16 veces después de exposición corta, y 8- veces después de exposición larga).

10 - en carcinoma de colon HCT116, el conjugado DPV15-E-Chl es más eficiente que el Chl (12 veces después de exposición corta, y 8 veces después de exposición larga) y tan eficiente como el fármaco que se utiliza en clinic para esta indicación, a saber 5FUra.

- en carcinoma de colon HT29, resistente al conjugado 5FUra, DPV15-E-Chl es más eficiente que el Chl después de exposición corta (11 veces) y es más eficiente que el 5FUra después de exposición corta (≥17 veces).

(#: no existe explicación para el alto valor inesperado obtenido después de exposición larga).

15 La carencia de actividad para Chl no se debe al solvente utilizado para solubilización (etanol) cuando obtenemos los mismos resultados para DPV15-E-Chl solubilizado en agua y en etanol (datos no mostrados).

No obstante, el hecho que no detectemos ninguna actividad para Chl puede ser debido al hecho que no obtenemos una buena solubilización de Chl en etanol. En la literatura, se ha descrito una eficacia de Chl in vitro en B-CLL con un IC₅₀ mediano de 40.5 mM (Silber R., 1994, Blood, 84:3440).

20 **Ejemplo 5 Actividad de la molécula activa conjugada (Paclitaxel).**

1) Naturaleza del ligando.

25 Los taxanos son agentes citotóxicos que inhiben el huso mitótico durante la división celular a través de la inhibición de despolimerización de β-tubulina (Nogales E., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56:133). Los dos taxanos en uso clínico son paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®). El paclitaxel se extrae al final de la década de 1960 de la corteza del árbol del tejo del pacífico, Taxus brevifolia (Wall ME., 1995, Cancer Res. 55:753). Se obtiene docetaxel a mediados de la década de 1980 como parte de un esfuerzo químico principal para desarrollar un proceso de semi-síntesis para obtener paclitaxel y análogos utilizando 10-desacetil baccatina III, un precursor extraído de las espiguillas del árbol de tejo Europeo Taxus baccata (Gueritte-Voegelein F., 1991, J. Med. Chem., 34:992).

5 Los mecanismos de resistencia descritos más frecuentemente para paclitaxel son el fenotipo de resistencia multifármaco (MDR) mediado por la bomba de eflujo de membrana de P-glicoproteína 170 kDa (P-gp) codificada por el gen *mdr1* y que pueden extrudir un amplio rango de fármacos antineoplásicos. La sobreexpresión de este sistema de transporte se reconoce como un mecanismo relevante de resistencia a Taxol® (Zunino F., 1999, Drug Resist. Updat. 2:351).

El Paclitaxel no es soluble en agua, y se solubiliza en cremofor (aceite de ricino polioxietilado) o etanol. En la parte clínica, la administración de paclitaxel es intravenosa y estos 2 excipientes se han asociado con hipersensibilidad (HSR) en pacientes tratados con paclitaxel.

Los Vectores de Péptido Diatos de Acoplamiento (DPV) a paclitaxel (PTX) puede tener 2 ventajas:

- 10 - Los DPV pueden superar el fenotipo MDR debido a la expresión de P-gp.
 - Los DPV pueden aumentar la solubilidad en agua de paclitaxel.

Por lo tanto, los conjugados DPV-PTX pueden ser más solubles y más activos en tumores resistentes.

2) Conjugación.

Se conjugan paclitaxel (PTX) y DPV.

15 Se comparan los conjugados DPV15/DPV3-E-PTX con:

- paclitaxel no formulado de Hauser (Lot # Tech-6-00600-A)
- Taxol® formulado de grado clínico de Bristol-Myers Squibb (Lot # 01H25-A).

El paclitaxel no es soluble en soluciones acuosas pero se puede solubilizar en aceite de ricino polioxietilado (cremofores EL, Sigma cat#C5135).

20 Para ensayos de viabilidad, se solubiliza el paclitaxel a 5 mM en agua que contiene 20 % de cremofor EL, luego se diluye en medio de cultivo a 500 nM (ya que la concentración mayor se prueba en células contenidas de 2 % de cremofor EL).

Se suministran conjugados DPV15-E-PTX y DPV3-e-PTX por Laboratoire de Chimie Bioorganique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (LCBBMC) at Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP).

25 Se conjugan paclitaxel (de Hauser) a DPV15 y DPV3 con un enlace éster (E) en el grupo 2'-OH. Este grupo 2'-OH es importante para la actividad de paclitaxel (ver figuras 30 y 31). Por lo tanto, los conjugados DPV-E-PTX son parcialmente activos, estos son profármacos que son completamente activos después de división del enlace éster por las esterasas.

DPV15:

30 NH₂-L R R E R Q S R L R R E R Q S R-Cys-COOH (16 + 1 aa)

Localización nuclear: como se reporta en el estudio en la internalización de conjugados de DPV-Peroxidasa y el estudio en la internalización de los conjugados anti Peroxidasa del anticuerpo DPV.

DPV3:

NH₂-R K K R R R E S R K K R R R E S-Cys-COOH (16 + 1 aa)

35 Localización citoplásmica: como se reporta en el estudio en internalización de conjugados DPV-Peroxidasa y el estudio en internalización de conjugados anti Peroxidasa del anticuerpo DPV.

Observación: Se ha agregado una cisteína (Cys) a las secuencias de aminoácidos DPV para conjugación. DPV15-E-PTX (ver fórmula en la Figura 31).

Peso molecular teórico: 3331.73

Solubilidad: soluble en agua (≥ 10 mg/ml)

Contra-ión: TFA

2 Lotes para DPV15:

DIAT0049 (ALL0050) 55 mg (06/12/2001) pureza HPLC >99%, contenido neto del péptido = 80%

5 DIAT0050 (ALL0050bis) 15 mg (06/12/2001) pureza HPLC >99%, contenido neto de péptido = 88%

DPV3: DIAT0057, pureza HPLC >99%

3) Ensayo de viabilidad.

3.1) Estirpes celulares humanas.

10 OVCAR-3: carcinoma de ovario humano (origen: ATCC #HTB-161) NCI-H1299: carcinoma pulmonar no microcítico humano (NSCLC) (origen: ATCC #CRL-5803)

MES-SA/Dx5: sarcoma uterino humano, resistente a paclitaxel, que expresa P-gp alto (origen: ATCC #CCL-1977).

3.2) Ensayo de viabilidad.

15 Se realizan ensayos de viabilidad. En resumen, se siembran células en placas de 96 pozos y se incuban con concentraciones aumentadas de fármacos durante 1 hora después que las células se enjuagan y se incuban con medio fresco sin fármacos durante 72 horas. Se realiza una prueba WST-1 (de Roche) y los valores de IC_{50} (la concentración de fármaco que inhibe 50 % de la viabilidad celular) se estiman de regresiones sigmoidales.

4) Resultados.

20 Se comparan los conjugados DPV15-E-PTX y DPV3-E-PTX en paclitaxel no formulado (de Hauser), Taxol® formulado de grado clínico (de BMS), Doxorubicina (Dox) y conjugado DPV1047-E-Dox (este conjugado se ha descrito en la solicitud de patente PCT publicada bajo el número WO 01/64738; DPV1047 se reporta como localización nuclear).

DPV1047:

NH_2 -Cys-V K R G L K L R H V R P R V T R M D V-COOH (19 + 1 aminoácidos) (Se ha agregado una cisteína (Cys) a la secuencia de aminoácidos DPV para conjugación).

25 Probamos la inhibición de proliferación celular in vitro de células de carcinoma humano, y calculamos los valores IC_{50} = concentración de fármaco que inhibe 50 % de viabilidad celular.

Tabla 11

Valores IC_{50} (mM)*	1h de incubación + 72h post-incubación					
	Dox	Paclitaxel 1 (Hauser)	® Taxol (BMS)	DPV15 - EPTX	DPV3 -E- PTX	DPV1047 - EDox
Carcinoma de ovario OVCAR	7.3 ± 4.2 (n=6)	0.04 ± 0.02 (n=6)	0.02 ± 0 (n=2)	0.37 ± 0.05 (n=5)	0.34 ± 0.19 (n=5)	8 ± 2 (n=2)

(continuación)

Valores IC ₅₀ (mM)*	1h de incubación + 72h post-incubación					
	Dox	Paclitaxe 1 (Hauser)	® Taxol (BMS)	DPV15 - EPTX	DPV3 -E- PTX	DPV10 47 - EDox
H1299 NSCLC	0.62 ± 0.32 (n=6)	0.23 ± 0.17 (n=6)	0.028 ± 0.004 (n=2)	4.3 ± 2.7 (n=4)	3.4 ± 2.8 (n=5)	0.65 ± 0.28 (n=2)
MES-SA/ Dx5 uterine sarcoma	350 ± 111 (n=5)	> 500 (n=6)	> 500 (n=2)	33 ± 5.7 (n=5)	16 ± 2.2 (n=5)	90 ± 0 (n=2)

* valor medio de n experimentos independientes ± desviación estándar.

El Paclitaxel de Hauser se solubiliza en Cremofor EL

Ya se ha formulado Taxol® de BMS (en Cremofor EL).

5 Se solubilizan DPV15-E-PTX y DPV3-E-PTX en agua.

La citotoxicidad observada con paclitaxel libre (de Hauser) solubilizado en cremofor EL no se debe al solvente para solubilización cuando no observamos ninguna citotoxicidad del solvente solo, en la concentración máxima utilizada (2 %) (datos no mostrados).

10 La comparación entre paclitaxel no formulado de Hauser (solubilizado en Cremofor EL) y Taxol® formulado grado clínico de BMS muestra la misma eficacia (excepto en células H1299 donde Taxol® es 10 veces más eficiente que el paclitaxel).

En término de solubilización.

La conjugación de DPV15 y DPV3 con paclitaxel con un enlace éster conducen a conjugados solubles en agua.

En términos de eficacia en la proliferación celular de tumor in vitro.

15 - en carcinoma de ovario OVCAR-3 sensible a doxorubicina y paclitaxel, ambos conjugados DPV-E-PTX son menos eficientes que el paclitaxel (9 veces) y más eficientes que la doxorubicina y el conjugado DPV1047-E-Dox (22 veces).

20 - en carcinoma no microcítico H1299 sensible a doxorubicina y paclitaxel, ambos conjugados DPV-E-PTX son menos eficientes que paclitaxel (16 veces) y menos eficiente que la doxorubicina y el conjugado DPV1047-E-Dox (6 veces).

- en sarcoma uterino MES-SA/Dx5 resistente a la doxorubicina y paclitaxel, ambos conjugados DPV-E-PTX son más eficientes que el paclitaxel (15- a 31 veces), doxorubicina (10- a 22 veces) y conjugado DPV1047-E-Dox (3- a 5.5 veces).

Ejemplo 6 Evaluación de toxicidad del conjugado de DPV15-Amfotericina B.

25 1) Naturaleza del ligando.

La amfotericina B (AmB), una macrolida de heptano producida por *Streptomyces nodosus*, es uno de los antibióticos más potentes y efectivos utilizados para combatir las infecciones fúngicas sistémicas, a pesar de su toxicidad. El AmB ejerce efectos tóxicos en las membranas biológicas al adherir los esteroides dentro de las membranas celulares.

Este se une al ergosterol en la membrana celular fúngica y en colesterol en células de mamífero (por lo tanto su toxicidad) por medio de enlaces de hidrógeno y fuerzas van der Waals.

2) Conjugación

Se ha conjugado amfotericina B (AmB) con DPV15 con un enlace de éster.

5 DPV15: NH₂-L R R E R Q S R L R R E R Q S R-Cys-COOH (se ha agregado cisteína para conjugación).

10 A una solución de DPV15 (112 mg) en agua (3.4 ml) se agrega borohidruro de sodio (12 mg; 0.34 mmol) y la solución se agita a 22° C durante 20 min. Se destruye el exceso de NaBH₄ mediante la adición de acético (0.037 ml, 0.68 mmol). Se ajusta el pH de la solución a 5.5 agregando NaHCO₃ sólido. Se agrega en forma de gotas una solución de amida maleimidocaproil Amfotericina B (40 mg, 0.034 mmol) en dimetilformamida (1.5 ml) al péptido reducido y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La purificación mediante HPLC, seguido por liofilización da la sal de trifluoroacetato del conjugado DPV15-AmB.

La Figura 32 muestra la fórmula del conjugado DPV15-AmB.

3) Ensayo de eficacia in vitro

15 La actividad antifúngica in vitro del conjugado DPV15-AmB se ha evaluado cuatro especies fúngicas a saber, Candida parapsilosis (ATCC 22019), Candida albicans (ATCC 90028), Aspergillus fumigatus (IP 2001/183.02) y Cryptococcus neoformans (NIH 52D) y comparado con Amfotericina B y DPV15. MIC80 (la concentración menor del fármaco que reduce el crecimiento de la cepa al 80 % comparado con el fármaco de control libre) se ha realizado de acuerdo con los estándares NCCLS M27A (Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico, documento M27A), utilizando una modificación microtítulo del estándar NCCLS M27A, en RPMI 1640 regulado con MOPS. Se ha determinado esta Concentración Inhibidora Mínima después de 48 horas y la temperatura de incubación es 37° C.

Resultados:

Se reportan la actividad in vitro de DPV15-AmB y comparadores contra las especies fúngicas en la tabla 12 adelante.

25 Tabla 12

Cepas	MIC (mg/ml)		
	DPV15-AmB*	AmB*	DPV15
Candida parapsilosis	0.5	0.25	>8
Candida albicans	0.5	0.5	>8
Cryptococcus neoformans	0.25	0.06	>8
Aspergillus fumigatus	4	1	>8
* Los MIC80 se expresan en mg/ml del producto activo AmB.			

30 Como se muestra en la Tabla 12, se mantiene la actividad antifúngica de AmB después de acoplamiento con DPV15. El conjugado DPV15-AmB inhibe el crecimiento de las cepas Candida en una concentración igual a AmB. Se aumenta el MIC de DPV15-AmB (factor x4) contra Cryptococcus y Aspergillus en comparación de AmB pero el conjugado permanece como un producto activo (MIC < 8 mg/ml).*

4) Actividad antifúngica in vivo

Se ha evaluado la actividad antifúngica In vivo de DPV15-AmB en un modelo de candidiasis de murino letal (cepa sensible a AmB). Los ratones se inoculan mediante administración intravenosa (i.v.) con un LD100 (100 % de dosis

letal) de *Candida albicans* (ATCC 90028). Se administran sustancias de prueba (DPV15-AmB y AmB (Fungizona)) y el vehículo de control i.v. con dosis que varían desde 0.25 mg/kg hasta 2.5 mg/kg de AmB equivalente a los animales de prueba 3 horas después de la inoculación fúngica. La mortalidad se registra una vez al día durante 8 días.

5 La Figura 33 muestra que ninguno de los regímenes de tratamiento resulta en 100 % de supervivencia. Sin embargo 1 y 0.5 mg/kg de AmB equivalente del conjugado DPV15-AmB (denotado AmB-DPV15 en la Figura) da 50 % de supervivencia en el día 8, cuando se compara con 20 % y 10 % de supervivencia para las mismas concentraciones de fungizona, respectivamente. Se obtiene 50 % de supervivencia con 2.5 mg/kg de AmB (Fungizona) en el día 8. La diferencia en las dosis correspondientes muestra una prevención de mortalidad durante una semana lo que sugiere que el DPV15-AmB es activo en una dosis menor que el compuesto de referencia (Fungizona).
10

5) Evaluación de toxicidad in vivo

5-a) Actividad hemolítica

Se muestra la conjugación de DPV15 a AmB para mejorar grandemente la solubilidad de la molécula. La inyección intra-venosa es aquella más favorable, se ha probado la actividad citotóxica del conjugado en Glóbulos Rojos Humanos. Las concentraciones de prueba son de 0 a 4 mg/ml. Se ha comparado la actividad hemolítica del conjugado con AmB y Abelcet™ (formulación de lípido de AmB).
15

Se incuban glóbulos rojos humanos en la presencia de las diversas moléculas durante 1 hora a 37° C. Los productos se diluyen como se indica en la Figura 34. El porcentaje de hemólisis se da como la media de dos valores independientes. La Figura 34 muestra un IC₅₀ para AmB de cerca de 1 mg/ml, que corresponde al valor expuesto en la literatura (Tabosa Do Egito et al., In-vitro and In-vivo evaluation of a new amphotericin B emulsion-based delivery system. *J Antimicrob Chemother.* 1996 Sep; 38 (3): 485-97). En contraste, 50 % de hemólisis nunca alcanza a los conjugados AmB-DPV15 (denotado como AmB-DPV15 en la figura) en el rango de concentraciones que se prueban. La conjugación de AmB al péptido DPV15 disminuye su actividad hemolítica.
20

5-b) Toxicidad de dosis única

25 La toxicidad de la dosis única del conjugado DPV15-AmB se evalúa mediante mortalidad y/o pérdida de peso corporal después de una única inyección intravenosa de dosis. Los ratones se tratan con DPV15-AmB 2.57, 3.68, 5.52, 7.36, 9.2, 18.4 y 36.8 mg/kg con vehículo (NaCl/H₂O 9/1 v/v). Estas dosis diferentes corresponden a 0.7, 1, 1.5, 2, 2.5, 5 y 10 mg/kg de AmB respectivamente. La dosis de 1 mg/kg corresponde a MTD de AmB expuesto en la literatura (Tabosa Do Egito et al., In-vitro and In-vivo evaluation of a new amphotericin B emulsion-based delivery system. *J Antimicrob Chemother.* 1996 Sep; 38 (3): 485-97).
30

Se observa la toxicidad letal aguda con la mayor dosis probada (36.8 mg/kg) pero no con otras.

En el Día 28, no se observa efecto en el peso corporal en ratones tratados con DPV15-AmB a 2.57, 3.68, 5.52, 7.36 y 9.2 mg/kg. Para ratones inyectados a 18.4 mg/kg, se encuentra que 1 ratón muere en la jaula 24 horas después de la inyección. Los dos otros ratones que sobreviven pierden aproximadamente 12 % de su peso corporal inicial 24 horas después de inyección. Después del Día 15, estos ratones vuelven a ganar peso. Estos datos sugieren que la dosis tolerada máxima del conjugado DPV15-AmB está entre 18.4 y 9.2 mg/kg (respectivamente 5 y 2.5 mg/kg AmB equivalente).
35

Ejemplo 7: Uso de los DPV para el suministro intracelular de anticuerpos de antígeno ¹²⁵I-anticarcinoembrionario (CEA).

40 El antígeno carcinoembrionario (CEA) es el antígeno de referencia para inmunotratamiento de los tumores gastrointestinales debido a una sobreexpresión en caso todos los tumores colorrectales (> 95 %), una alta expresión de la densidad antigénica (hasta 1x10⁶ moléculas CEA por célula) y un tiempo de residencia muy largo en la superficie celular. Sin embargo, en radioinmunoterapia (RIT), la no internalización de las reglas CEA fuera del uso de radioisótopos de bajo rango tal como emisores Auger que son atractivos para el tratamiento de nódulos de tumor muy pequeños. Con el fin de superar esta limitación, el DPV15 se ha utilizado para inducir la internalización del anticuerpo anti-CEA MAb 35A7 (denotado 37A7) y el potencial del conjugado 125I-35A7-DVP15 se ha analizado para terapia de electrones Auger.
45

1) Conjugación:

La conjugación se ha llevado a cabo siguiendo el plan general descrito en el ejemplo 2. Se ha utilizado succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para preparar los conjugados de anticuerpo-DPV que contienen 3 a 5 moléculas de péptidos por molécula de anticuerpo.

DPV15: $\text{NH}_2\text{-L R R E R Q S R L R R E R Q S R-Cys-COOH}$ (Se ha agregado cisteína para conjugación).

2) Estudios In vitro:

La internalización en células de adenocarcinoma de colon humano LS174T se analiza utilizando microscopía de inmunofluorescencia. La citotoxicidad se mide en un ensayo clonogénico. Se utiliza un anticuerpo irrelevante, PX, como control en todos los experimentos.

El análisis de inmunofluorescencia demuestra que el conjugado 35A7-DPV15 internalizado en LS174T células aunque el 35A7 nativo no.

En el ensayo clonogénico, el conjugado ^{125}I -35A7-DVP15 demuestra una citotoxicidad. El conjugado no radiomarcado 35A7 y 35A7-DPV15 así como también ^{125}I -35A7 no muestra ninguna citotoxicidad. El conjugado irrelevante, ^{125}I -PX-DPV15, exhibe una citotoxicidad limitada cuando se compara con ^{125}I -35A7-DVP15 demostrando la necesidad de un anticuerpo específico para erradicar todas las células LS174T.

Estos estudios in vitro demuestran que el efecto terapéutico de ^{125}I -35A7 es dependiente de la internalización debido a un rango de partícula muy corto del electrón Auger. Los ^{125}I -anti-CEA MAb derivados con DPV son candidatos potenciales para radioinmunoterapia de electrón Auger en cánceres digestivos.

3) Ensayo del efecto terapéutico in vivo de ^{125}I -35A7-DPV15

3.1) Primer estudio: inyección única

Se ha estudiado ^{125}I -35A7-DPV15 en ratones sin pelo SWISS con tumores LS174T comparado con NaCl. Los tumores LS174T se han establecido mediante inyección subcutánea 2×10^6 por ratón en el Día cero. Se ha inyectado una dosis única de ^{125}I -35A7-DPV15 mediante la ruta intravenosa (i.v.) 8 días después de trasplante de las células. Se ha inyectado ^{125}I -35A7-DPV15 a 0.125 mCi, 0.25 mCi, 0.5 mCi y 1 mCi. El volumen del tumor, la toxicidad medular y el peso del ratón se observan y se controlan hasta 45 días después de trasplante.

Este primer estudio in vivo muestra una disminución en el crecimiento de tumor LS174T cuando se utiliza ^{125}I -35A7-DPV15 comparado con NaCl. Estos resultados sugieren que la dosis efectiva debe ser superior a 1 mCi. Adicionalmente, no se ha observado toxicidad.

3.2) Segundo estudio: dos inyecciones

En el segundo estudio, se han tratado ratones sin pelo SWISS con tumores LS174T con dos inyecciones de ^{125}I -35A7-DPV15 comparado con NaCl. El conjugado se ha inyectado mediante la ruta intravenosa (iv) 8 y 12 días después de trasplante de células. Las dosis utilizadas son $2 \times \text{NaCl}$, $2 \times 0.5 \text{mCi}$ y $2 \times 1 \text{mCi}$. El volumen del tumor, la toxicidad medular y el peso de los ratones se observan y controlan hasta 60 días después de trasplante.

El crecimiento del tumor se ha disminuido significativamente mediante tratamiento comparado con NaCl. El tiempo de supervivencia medio es 20 días para los ratones en el grupo tratado con NaCl, 30 días para los ratones en el grupo tratado con $2 \times 0.5 \text{mCi}$ ^{125}I -35A7-DPV15 y aproximadamente 40 días para los ratones en el grupo tratado con $2 \times 1 \text{mCi}$ ^{125}I -35A7-DPV15. Adicionalmente, no se ha observado toxicidad.

Ejemplo 8 – Estudios de eficacia In vivo de los conjugados de Doxorubicina DPV15- y DPV15b-

1) Péptidos de acoplamiento a doxorubicina

La doxorubicina, una gente antineoplásico, se ha conjugado con DPV15 y DPV15b siguiendo el proceso descrito en la solicitud de patente PCT, número de publicación WO 04/011033.

DPV15: NH₂-L R R E R Q S R L R R E R Q S R-Cys-COOH

DPV15b: NH₂-Cys-G A Y D L R R E R Q S R L R R E R Q S R-COOH

Se ha agregado un residuo de cisteína para conjugación.

2) Método

5 Ratones: Ratones sin pelo atímicos (nu/nu), hembra, NMRI-nu (nu/nu)-Sin pelo

Modelo de tumor: carcinoma colorrectal HCT116 humano (número ATCC: CCI-247)

Se ha realizado experimento en ratones que llevan tumores. Los tumores HCT116 se han establecido mediante inyección intradérmica de 100 µl de la suspensión celular (10⁷ células/0.1 mL) en el flanco derecho del ratón.

10 Los fármacos se diluyen en agua (Cooper) para inyección (10 % del volumen final). Después que se completa la disolución se agrega una solución de 0.9 % de NaCl para inyección (Cooper) 0.9 %. Las soluciones se filtran en un filtro de 0.2 µm. Se controlan la concentración de doxorubicina y DPV-doxorubicina en espectrofotometría con la curva estándar de la concentración de doxorubicina.

Primer experimento: DPV15-doxorubicina

15 Las soluciones se inyectan mediante la ruta intravenosa (i.v) en la vena lateral de la cola a 3.5, 5 y 6.5 mmol/kg para la doxorubicina y 15 mmol/kg para el DPV15-Dox siguiendo un programa de administración Q2D3x3W (3 inyecciones a la semana separadas 2 días aparte durante 3 semanas).

Segundo experimento: DPV15b-doxorubicina

Las soluciones se inyectan mediante la ruta iv en la vena lateral de la cola a 5, 6 y 7 mmol/kg para la doxorubicina y 10 mmol/kg para el conjugado DPV15b-Dox siguiendo un programa de administración Q2D3x3W.

20 2) Resultados

Primer experimento:

La Figura 35 muestra actividad anti-neoplásica del conjugado DPV15-doxorubicina. El volumen del tumor (mm³) se exhibe como una función de tiempo (días) después de implante celular.

La siguiente tabla 13 muestra los retrasos del crecimiento de Tumor y los tiempos de duplicación de Tumor.

25 Tabla 13

	Retraso de crecimiento de tumor (días)	Tiempo de duplicación de tumor (días)
Control (NaCl)	16.55	6.4
DPV15-doxo: 15 mmol/kg	43.38	11.40
Doxorubicina: 3.5 mmol/kg	21.20	10.20
Doxorubicina: 5 mmol/kg	26.40	14.20
Doxorubicina: 6.5 mmol/kg	35.29	22.90

La DPV15-doxorubicina muestra una mayor actividad antitumoral que la doxorubicina libre a 6.5 mmol/kg (la dosis más alta probada) en este modelo.

Segundo experimento:

La Figura 36 muestra actividad anti-neoplásica del conjugado DPV15b-doxorrubicina. El volumen del tumor (mm^3) se exhibe como una función de tiempo (días) después de implante celular. La DPV15b-doxorrubicina se denota DPV15b-E-doxo en la gráfica.

- 5 La siguiente tabla 14 muestra los retrasos del crecimiento de tumor y los tiempos de Tumor de duplicación de Tumor.

Tabla 14

	Retraso de crecimiento de tumor (días)	Tiempo de duplicación de tumor (días)
Control (NaCl)	13.72	4.36
DPV15b-doxo: 10 mmol/kg	34.17	20.82
Doxorrubicina: 5 mmol/kg	27.86	15.38
Doxorrubicina: 6 mmol/kg	29.98	16.24
Doxorrubicina: 7 mmol/kg	35.16	13.38

- 10 La DPV15b-doxorrubicina a 10 mmol/kg muestra una actividad antitumoral mayor que la doxorrubicina libre a 6 mmol/kg (mayor que la doxorrubicina MTD en este modelo), y muestra menor actividad que la doxorrubicina libre a 7 mmol/kg. Sin embargo, la doxorrubicina en esta dosis (7 mmol/kg) exhibe toxicidad importante (pérdida de peso corporal de los ratones superior a 20 % y signos de neurotoxicidad).

3) Conclusión

La conjugación de doxorrubicina con DPV15 o DPV15b induce a una reducción de la toxicidad de doxorrubicina y permite un aumento en su actividad antitumoral.

- 15 **Ejemplo 9 – Evaluación in vivo de la actividad anti-neoplásica del conjugado de DPV7b-doxorrubicina**

1) Péptidos de acoplamiento a doxorrubicina

La doxorrubicina se ha conjugado con DPV7b de acuerdo con los procesos descritos en la solicitud de patente PCT, número de publicación WO 04/011033.

DPV7b: $\text{NH}_2\text{-G K R K K K G K L G K K R P R S R-Cys-COOH}$ (se ha agregado cisteína para conjugación).

- 20 2) Evaluación in vivo

Método

- 25 Se inyectan ratones sin pelo con 10^7 células HCT116 (estirpe celular colorrectal HCT116 humano) intradérmicamente en el flanco derecho. Se realizan tratamientos en tumores sólidos establecidos (el tamaño de los tumores es aproximadamente 80 a 90 mm^3) en el Día 3. Los ratones se aleatorizan en diferentes grupos (tamaño equivalente de los tumores), 6 ratones por grupo. Se tratan tres grupos de ratones (Inyección, 200 μl /ratones (20 g) con Micro-fine +, U-100 insulina 0.5 ml, 0.33x12.7 mm/29G1/2: Becton Dickinson), el grupo de control (NaCl), grupo tratado (DPV7b-doxorrubicina: 15 mmol/kg) y grupo de control tratado (doxorrubicina: 3.5, 5 y 6.5 mmol/kg).

Se realizan inyecciones mediante la ruta i.v. (intravenosa) en la vena de la cola a D3 (Día 3), D5, D7, D10, D12, D14, D17, D19, D21 (programa de administración Q2D3x3W).

Se controlan el tamaño y peso de los tumores, en los días de inyección y cada 3-4 días después de tratamiento, al final del experimento (día 52).

Resultados:

5 La Figura 37 muestra actividad anti-neoplásica del conjugado DPV7b-doxorrubicina. Se exhibe el volumen del tumor (mm^3) como una función de tiempo (días) después de implante celular.

La siguiente tabla 15 muestra los retrasos de crecimiento de tumor y tiempos de duplicación de tumor.

Tabla 15

	Retraso de crecimiento de tumor (días)	Tiempo de duplicación de tumor (días)
Control (NaCl)	16.55	6.4
DPV7b-doxo: 15 mmol/kg	39.00	12.2
Doxorrubicina: 3.5 mmol/kg	21.20	10.2
Doxorrubicina: 5 mmol/kg	26.40	14.6
Doxorrubicina: 6.5 mmol/kg	35.29	22.9

El conjugado DPV7b-doxorrubicina muestra una eficacia antineoplásica in vivo en tumor HCT116.

10 **Ejemplo 10 – Evaluación in vivo de la actividad anti-neoplásica del conjugado DPV3-ARNsa A**

La ARNsa A (Ribonucleasa A) exhibe una masa molecular de 14.4 kDa.

1) Péptidos de acoplamiento a Ribonucleasa A

Se preparan los conjugados DPV3-ARNsa siguiendo el plan general (ver Ejemplo 1).

DPV3: $\text{NH}_2\text{-R K K R R R E S R K K R R R E S-Cys-COOH}$ (se ha agregado cisteína para conjugación).

15 2) Método de evaluación in vivo

Se inyectan ratones sin pelo NMri con células de carcinoma colorrectal HCT116 humano intradérmicamente en el flanco derecho.

Los ratones se tratan mediante inyección peri-tumoral de una solución de $\text{H}_2\text{O/NaCl}$ (v/v: 1/9), ARNsa (100 mg, 0,5 mg/ml) y DPV3-ARNsa (100 mg, 0,5 mg/ml), siguiendo un programa de administración Q2D3x2W.

20 Resultados

Los resultados de muestran en la Figura 38: se exhibe el volumen del tumor (mm^3) como una función de tiempo (días) después de implante celular.

La administración de 600 mg de DPV3-ARNsa A durante un periodo de dos semanas reduce el crecimiento del tumor cuando se compara solo con ARNsa A.

25 **Ejemplo 11 – Internalizaciones comparativas in vitro de los conjugados de DPV-Peroxidasa (DPV-PO)**

Se selecciona peroxidasa (PO) para representar la capacidad de los DPV para internalizar las proteínas de tamaño medio (40 000 Da). El uso de una forma preactiva de la proteína permite la preparación de conjugados homogéneos (solo 1 DPV por molécula PO). La penetración de los conjugados DPV-PO se prueba en estirpes celulares HCT116 (carcinoma colorrectal) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix).

ES 2 378 312 T3

Se ha llevado a cabo el protocolo de conjugación e internalización de acuerdo con el Ejemplo 1.

DPV comparado:

DPV3: NH₂-R K K R R R E S R K K R R R E S C-COOH

DPV3/10: NH₂-R K K R R R E S R R A R R S P R H L C-COOH

5 DPV6: NH₂-G R P R E S G K K R K R K R L K P C-COOH

DPV7: NH₂-G K R K K K G K L G K K R D P C-COOH

DPV7b NH₂-G K R K K K G K L G K K R P R S R C-COOH

DPV10: NH₂-S R R A R R S P R H L G S G C-COOH

DPV10/6: NH₂-S R R A R R S P R E S G K K R K R K R C-COOH

10 Respectivamente la SEQ ID No 4, 5, 6, 8, 9, 3, 7 con una Cisteína de terminal C.

Resultados

15 La penetración cuantitativa de los conjugados DPV-PO en células HCT116 se representa por Figura 39. Se realiza lisis celular después de 4 horas de incubación en una concentración inicial de los conjugados DPV-PO de 75 mg/ml (que corresponde a aproximadamente 1.8 mM). Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

La siguiente tabla 16 muestra cantidades netas de los conjugados DPV-PO internalizados en células HCT116. Los resultados se dan en picogramos PO / 1000 células.

Tabla 16

Conjugados	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV3-PO	147	41
DPV6-PO	111	18
DPV7-PO	54	7
DPV7b-PO	118	17
DPV10-PO	6	2
DPV3/10-PO	143	56
DPV10/6-PO	117	56
Cys-PO	1	1

20 La penetración cuantitativa de los conjugados DPV-PO en células HeLa se representa por la Figura 40. Las células se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados en una concentración inicial de 75 mg/ml. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

25 La siguiente tabla 17 muestra cantidades netas de los conjugados DPV-PO internalizados en células HeLa. Los resultados se dan en picogramos / 1000 células.

Tabla 17

Conjugados	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV3-PO	413	38
DPV6-PO	241	19
DPV7-PO	122	26
DPV7b-PO	337	53
DPV10-PO	24	5
DPV3/10-PO	338	84
DPV10/6-PO	327	78
Cys-PO	4	2

La siguiente tabla 18 describe la ubicación celular y la acumulación del nivel intracelular de los conjugados DPV-PO.

Tabla 18

Conjugados	Ubicación predominante	Acumulación del nivel intracelular
DPV10-PO	Nuclear	Baja
DPV7-PO	Citoplásmico	Media
DPV3-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV6-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV7b-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV3/10-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV10/6-PO	Citoplásmico	ALTA

5

El nivel de acumulación intracelular DPV-PO es variable, como una función del DPV, y como una función de la estirpe celular (siempre mayor en células HeLa). La repartición general de los DPV no obstante es principalmente idéntica en las dos estirpes celular observadas, con tres grupos principales de acumulación intracelular alta, media o baja. Es importante notar que el nivel de acumulación intracelular de los DPV "nucleares" (DPV10) es mucho menor que aquella de los DPV "citoplásmicos" (DPV3, 6 y 7).

10

Ejemplo 12 - Acumulación comparativa In vitro intracelular en células adherentes de DPV-AntiPO IgG.

Se selecciona la inmunoglobulina anti-Peroxidasa (AntiPO-IgG o aPO) para representar la capacidad de los DPV para internalizar proteínas de muy alto peso molecular (150 000 Da). Se realizan experimentos de internalización en estirpes celulares HCT116 (carcinoma colorrectal) y HeLa (adenocarcinoma cervical). Se evalúa la acumulación intracelular en un único punto de tiempo (4 horas).

15

Se lleva a cabo el protocolo de conjugación e internalización de acuerdo con el Ejemplo 2.

Las secuencias de aminoácidos DPV utilizadas y comparadas son aquellas descritas en el Ejemplo 11.

Resultados:

5 La penetración cuantitativa de los conjugados DPV-antiPO IgG en células HCT116 se representa por la Figura 41. Las células se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados en una concentración inicial de 100 mg/ml. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

10 La siguiente tabla 19 muestra las cantidades de los conjugados DPV-antiPO IgG (denotado DPV-aPo) internalizados en células HCT116. Los resultados se dan en picogramos PO / 1000 células, como la media de tres experimentos independientes.

Tabla 19

Conjugados	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV3-PO	38,1	12,8
DPV6-PO	35,8	19,2
DPV7-PO	20,4	2,8
DPV7b-PO	36,5	6,3
DPV10-PO	5,8	2,3
DPV3/10-PO	33,3	6,7
DPV10/6-PO	34,4	8,7
Cys-PO	1,1	0,9

15 La penetración cuantitativa de los conjugados DPV-antiPO IgG en las células HeLa se representa por la Figura 42. Las células se incuban durante 4 horas en la presencia de los conjugados en una concentración inicial de 100mg/ml. Los resultados se dan como el valor medio obtenido en tres experimentos independientes, todos realizados en duplicados.

La siguiente tabla 20 muestra cantidades netas de los conjugados DPV-antiPO internalizados en células HeLa. Los resultados se dan como el valor medio de tres experimentos independientes, en picogramos PO / 1000 células.

Tabla 20

Conjugados	pg PO/1000 células	Desviación estándar
DPV3-PO	117,0	21,2
DPV6-PO	111,9	33,5
DPV7-PO	75,3	12,4
DPV7b-PO	138,7	45,6
DPV10-PO	23,0	7,6

DPV3/10-PO	181,0	45,6
DPV10/6-PO	119,4	46,4
Cys-PO	1,7	2,2

La siguiente tabla 21 describe la ubicación celular y el nivel de acumulación intracelular de los conjugados DPV-antiPO.

Tabla 21

Conjugados	Ubicación predominante	Acumulación del nivel intracelular
DPV10-PO	Nuclear	Baja
DPV7-PO	Citoplásmico	Media
DPV3-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV6-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV7b-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV3/10-PO	Citoplásmico	ALTA
DPV10/6-PO	Citoplásmico	ALTA

5

El nivel de internalización de los conjugados DPV-IgG es diferente en las dos estirpes celulares probadas. La acumulación intracelular siempre es más fuerte en células HeLa. Más aún, la clasificación de los conjugados en tres grupos que consideran su nivel de acumulación intracelular también conduce a la misma repartición exacta de los DPV cualquiera que sea de los dos que se conjuga (PO o inmunoglobulina).

10 **Ejemplo 13 – Internalizaciones comparativas in vitro de los conjugados DPV-TMR (TMR: Tetrametilrodamina-5-maleimida)**

La penetración de los conjugados DPV-TMR se prueba en las estirpes celulares HCT116 (carcinoma colorrectal) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix).

Se ha llevado a cabo el protocolo de conjugación e internalización de acuerdo con el Ejemplo 3.

15 Las secuencias de aminoácidos DPV utilizados y comparados son aquellos descritos en el Ejemplo 11.

Resultados

El nivel de internalización de los conjugados DPV-TMR en células HeLa y células HCT116 se representa por la Figura 43.

20 Después de la acumulación de los conjugados DPV-TMR durante dos horas a 37° C, las células se triptinizan, se someten a lisis, y se cuantifica la fluorescencia en los lisados celulares. Los resultados son la media de por lo menos 4 valores.

La siguiente tabla 22 muestra los niveles de internalización de los conjugados DPV-TMR. Los valores se dan en pg TMR / 1000 células en células HeLa y células HCT116 después de 2 horas de internalización a 37 °C, en una concentración inicial de 20 mM del conjugado.

Tabla 22

Conjugados	pg TMR / 1000 células	
	HeLa	HCT116
DPV10-TMR	0,00	6,78
DPV6-TMR	44,21	20,90
DPV7-TMR	65,90	28,61
DPV3-TMR	107,74	53,18
DPV7b-TMR	82,82	36,67
DPV3/10-TMR	103, 91	47,53
DPV10/6-TMR	99,23	38,57
Cys-TMR	0,00	0,91

5 Como se ve en La Figura 43 y la Tabla 22, existen diferencias importantes en el nivel de internalización de los diversos conjugados DPV-TMR, dependiendo del conjugado, y la estirpe celular. No obstante, como se observó previamente para los conjugados DPV-PO y DPV-IgG, la clasificación de los DPV como una función de la cantidad del TMR internalizado es similar en ambas estirpes celulares y es como sigue: DPV3 ≥ DPV3/10 ≥ DPV 10/6 ≥ DPV7b > DPV7 > DPV6 > DPV10.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DIATOS

10 <120> SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS QUE FACILITAN LA PENETRACIÓN DE UNA SUSTANCIA DE INTERÉS DENTRO DE LAS CÉLULAS Y/O NÚCLEOS CELULARES

<130> 33268/PCT

<140> PCT/IB04/xxxxx

<141> 2004-08-13

15 <150> EP 03292030.8 y FR03/09962 <151> 2003-08-14

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 378 312 T3

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

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

Arg Glu Arg Gln Ser Arg
20

<210> 3

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser
1 5 10 15

20 <210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg
1 5 10 15

25

ES 2 378 312 T3

His Leu

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

Pro

<210> 7

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys
1 5 10 15

Arg Lys Arg

<210> 8

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro
1 5 10 15

20 <210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 378 312 T3

Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys Lys Arg Pro Arg Ser
1 5 10 15

Arg

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Met Asp Val

REIVINDICACIONES

5 1. Una secuencia de aminoácidos que es capaz de facilitar la penetración de una sustancia de interés dentro de los núcleos celulares, dicha sustancia de interés se selecciona del grupo que comprende ácido nucleico, proteína, fármaco, antígeno, anticuerpo, polímero, marcador tal como fluorocromo, y dicha secuencia de aminoácidos tiene la siguiente fórmula:



En donde

X₁ es una secuencia de aminoácidos de 1 a 20 aminoácidos;

10 p es un número completo entre 0 y 5;

B es un aminoácido básico;

X es un aminoácidos no básico, preferiblemente hidrófobo, tal como alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina o tirosina.

2. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

15 - p es 0, y/o

- X₁ es una secuencia de 2 a 5 aminoácidos.

3. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que tiene menos de 100 aminoácidos.

20 4. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que tiene entre 18 a 25 aminoácidos.

5. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 tiene la siguiente fórmula:

- Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.2).

25 6. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que esta se une a un componente en la membrana celular y cruza dicha membrana celular por medio de dicho componente.

7. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho que es capaz de reaccionar con los aminoglicanos.

8. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el hecho que es capaz de reaccionar con los glicaminoglicanos.

30 9. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por el hecho que es capaz de reaccionar con heparina, sulfatos de condroitina y sus derivados.

10. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, acoplada a una secuencia derivada de un fragmento de anticuerpo, ventajosamente un fragmento de anticuerpo polirreactivo.

35 11. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la segunda secuencia de aminoácidos es toda o parte de una región hipervariable de un anticuerpo.

12. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde la segunda secuencia de aminoácidos es un fragmento de la cadena pesada de un anticuerpo.

13. Una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la segunda secuencia de aminoácidos es un anticuerpo anti-ADN humano o parte del mismo.

14. La secuencia de aminoácidos de la reivindicación 13, en donde dicho anticuerpo se selecciona entre el grupo que comprende IgM y IgG.
15. La secuencia de aminoácidos de la reivindicación 10, en donde la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que comprende toda o parte de una región CDR2, CDR3 de un anticuerpo.
- 5 16. El uso de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para preparar una composición para la transferencia de dicha sustancia de interés dentro de las células.
17. Un vector para transferencia intracitoplásmica y/o intracitosólica y/o intranuclear de dicha sustancia de interés, constituido por o que comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 10 18. El vector de la reivindicación 17 acoplado a por lo menos una de dicha sustancia de interés que se puede incorporar en forma natural o no natural dentro de las células y/o los núcleos de dichas células.
19. El vector de la reivindicación 18, en donde dicha sustancia de interés se acopla en el extremo del termina N o C de la secuencia de aminoácidos.
- 15 20. Un vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN, siARN, dsARN, SsARN y aARN.
21. Un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde dicha sustancia o sustancias de interés se acoplan a dicho vector por medio de por lo menos una molécula de anclaje que tiene una afinidad natural fuerte para dicha sustancia de interés.
- 20 22. Un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde la sustancia o sustancias de interés se acoplan a dicho vector mediante ingeniería genética o mediante acoplamiento químico, bioquímico o enzimático.
23. Una célula eucariótica, que excluye células embrionarias humanas, que contienen un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22.
- 25 24. Una composición biológica, farmacéutica, cosmética, agro-alimenticia, diagnóstica o de seguimiento, que comprende como ingrediente activo una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22 o una célula eucariótica de acuerdo con la reivindicación 23.

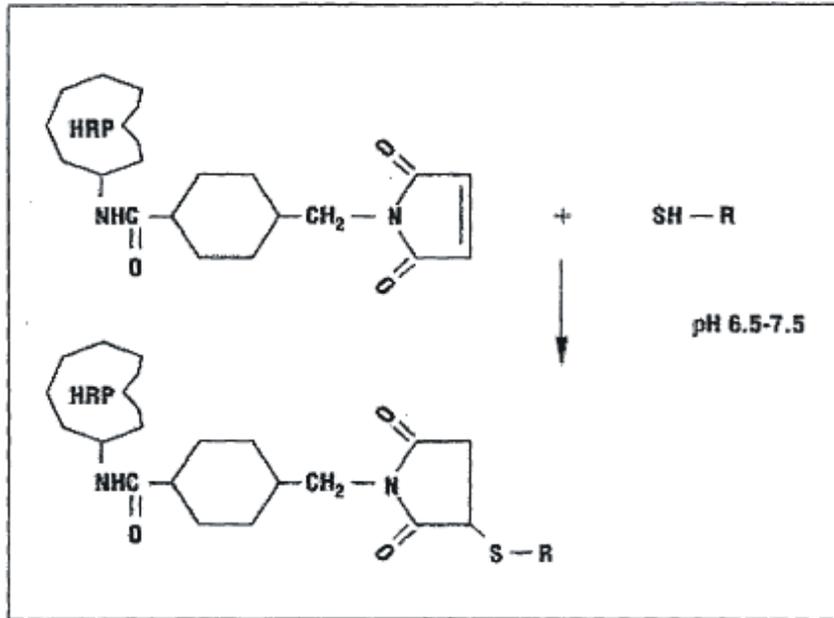


Figura 1

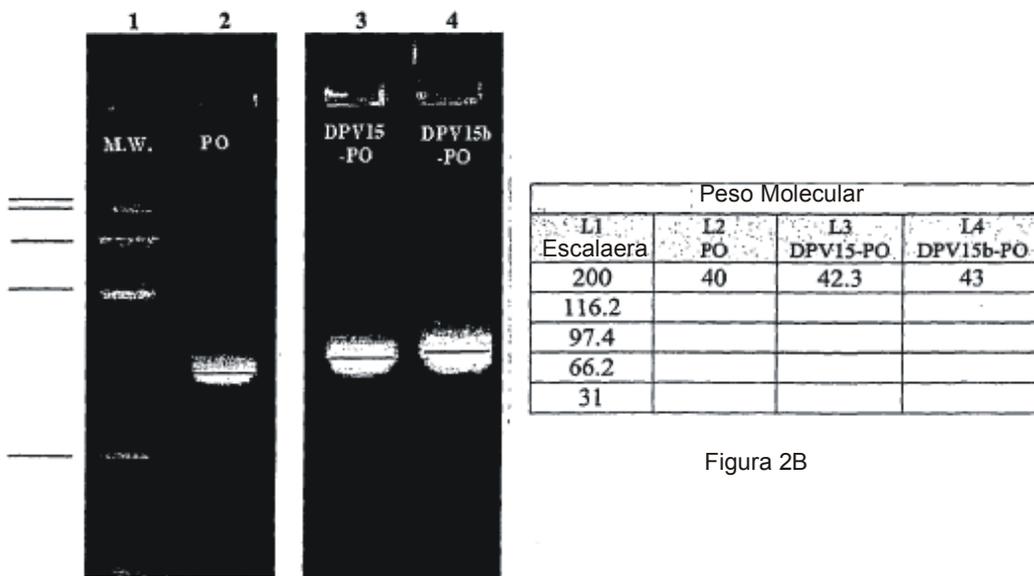


Figura 2A

Figura 2B

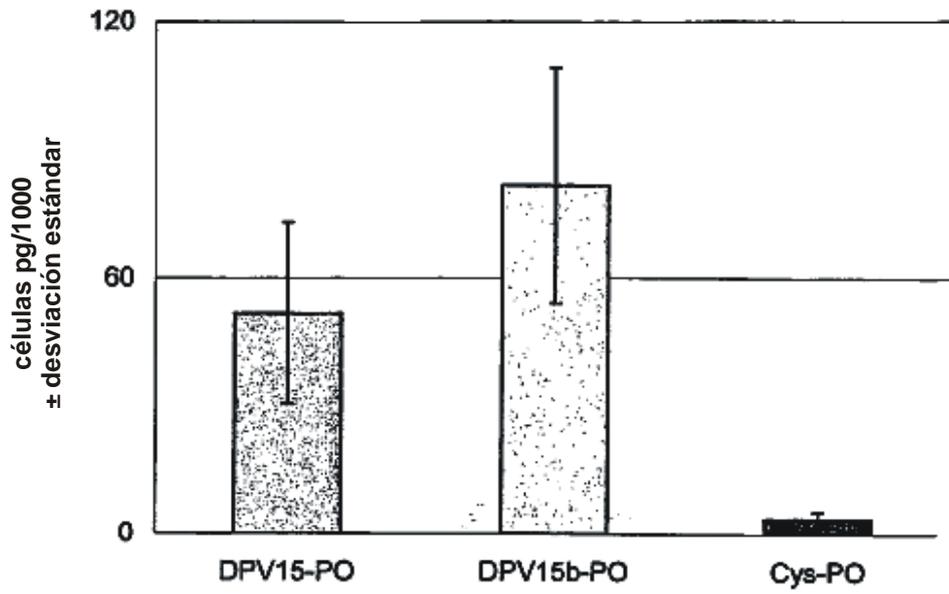


Figura 3

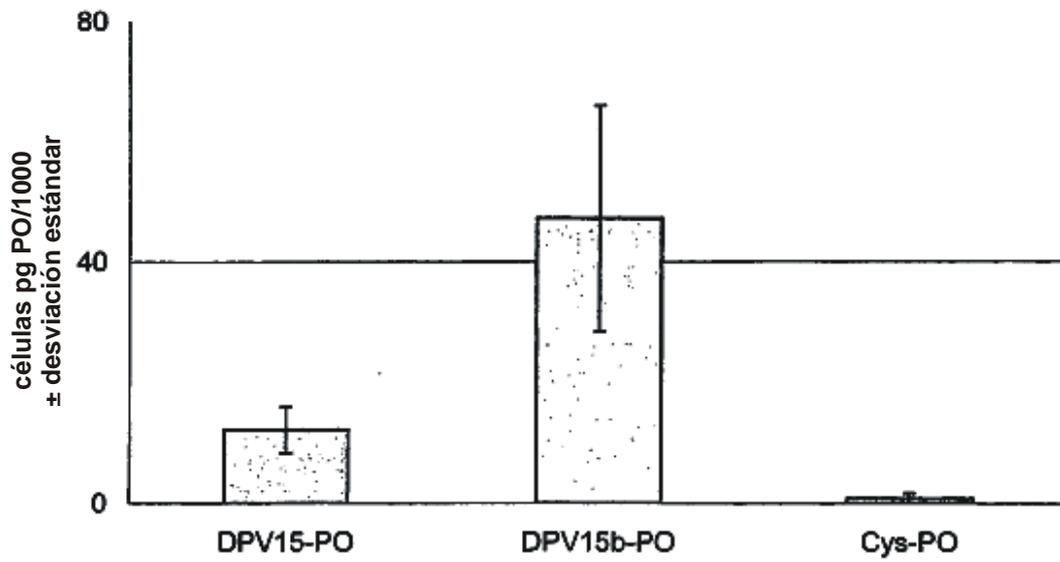


Figura 4

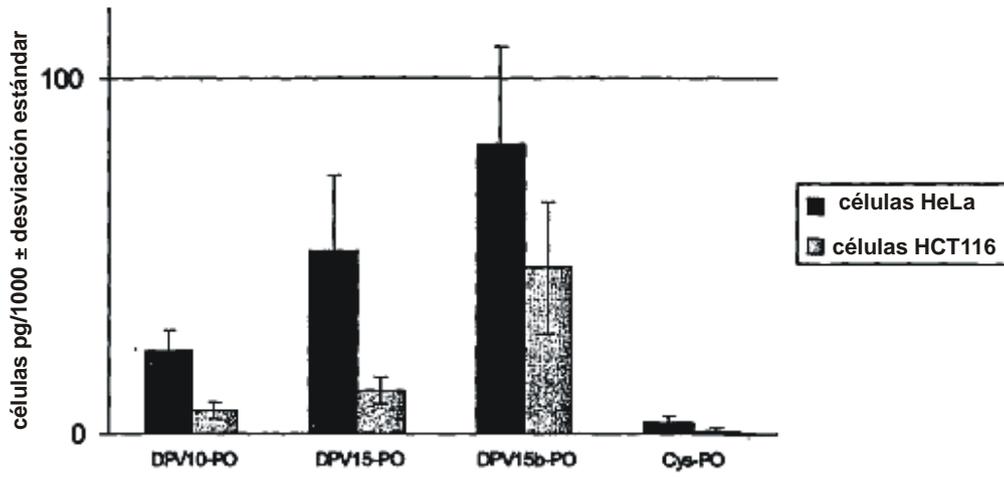


Figura 5

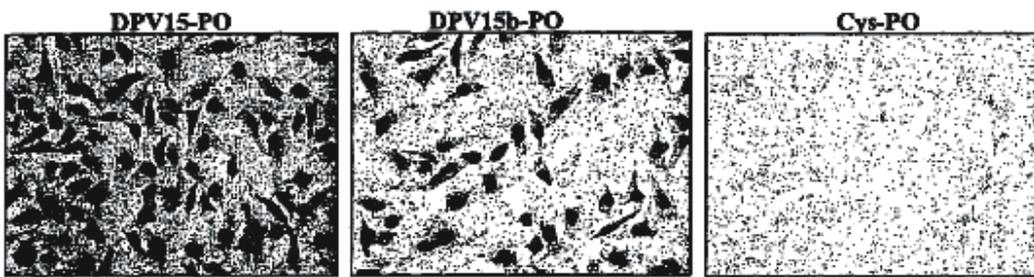


Figura 6



Figura 7

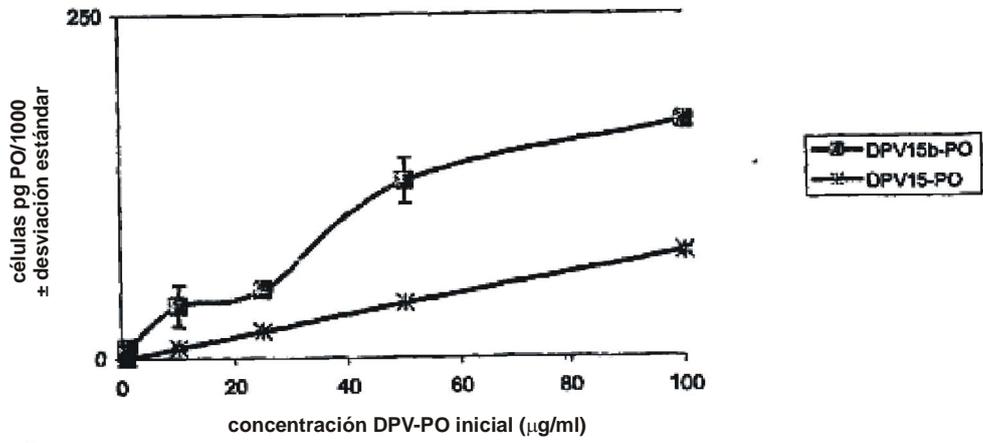


Figura 8

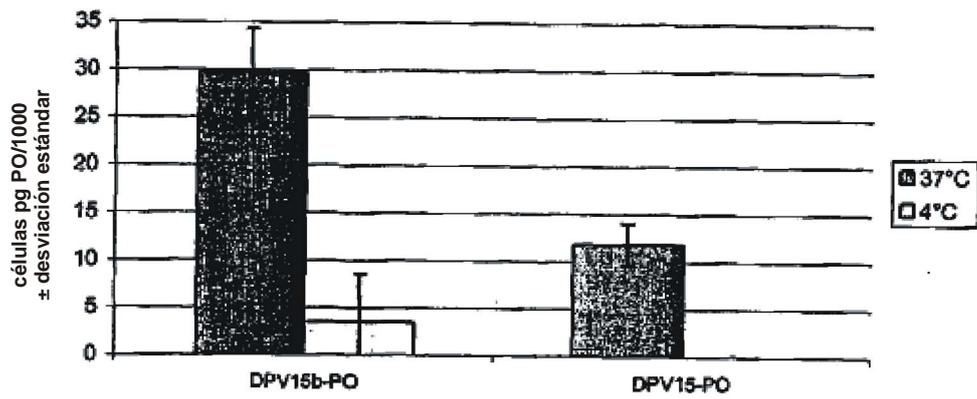


Figura 9

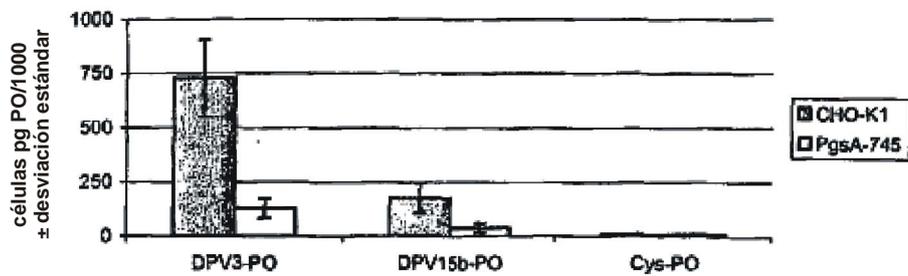


Figura 10

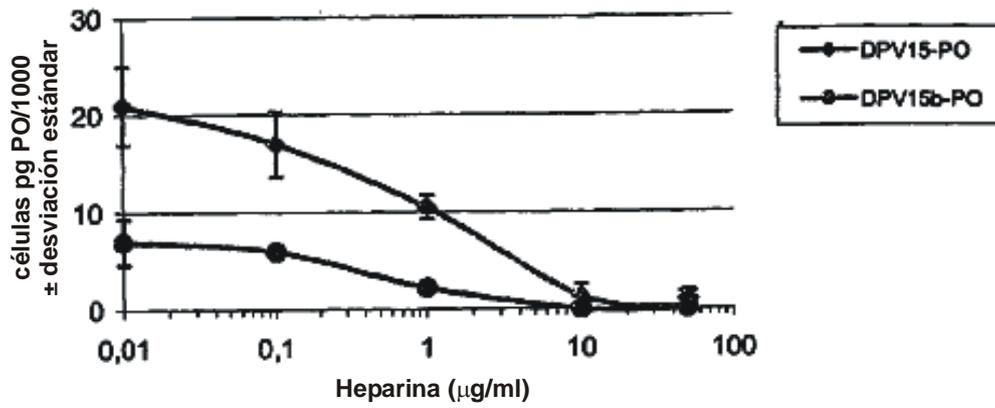


Figura 11

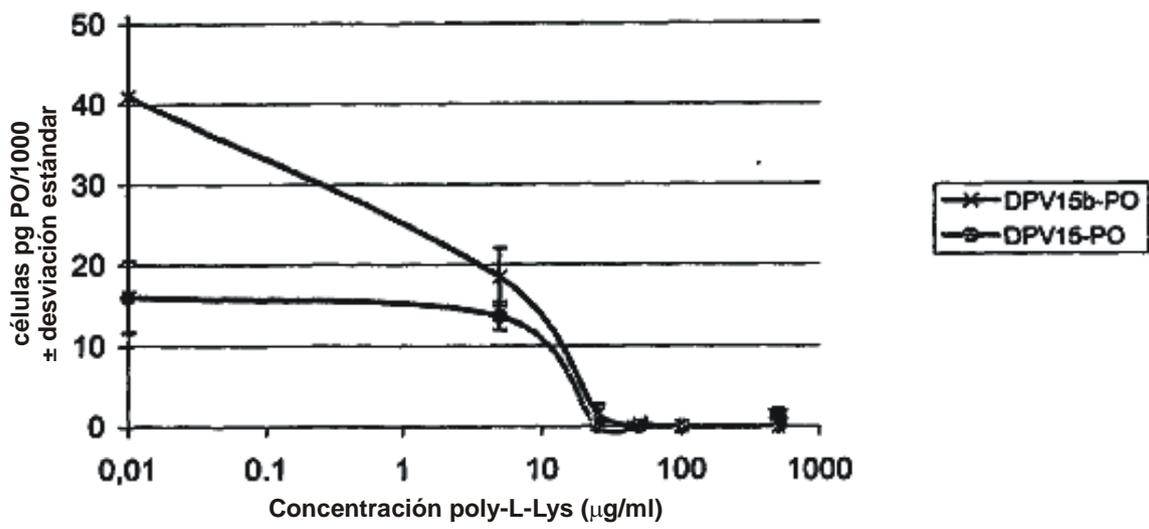
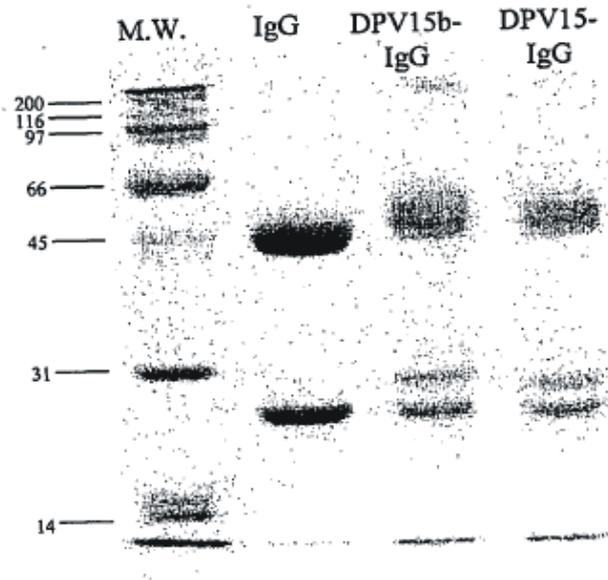


Figura 12



Línea 1: Peso Molecular Estándar
 Línea 2: IgG AntiPO
 Línea 3: conjugado IgG 15-AntiPO DPV
 Línea 4: conjugado IgG 15b-AntiPO DPV

Figura 13

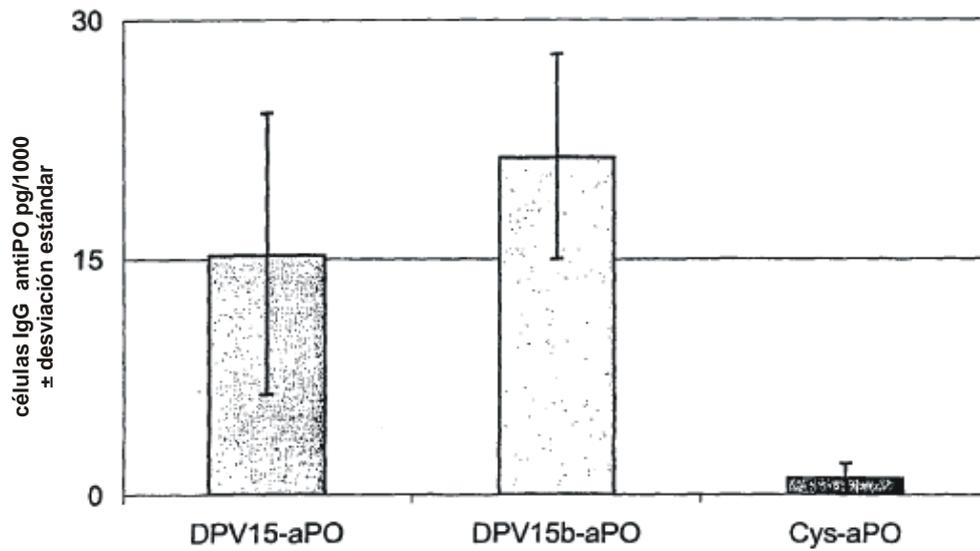


Figura 14

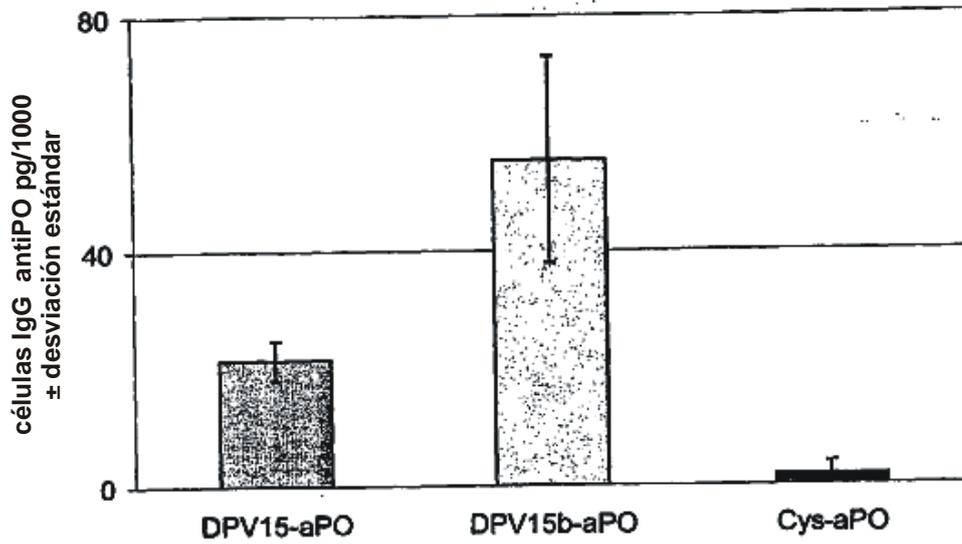


Figura 15

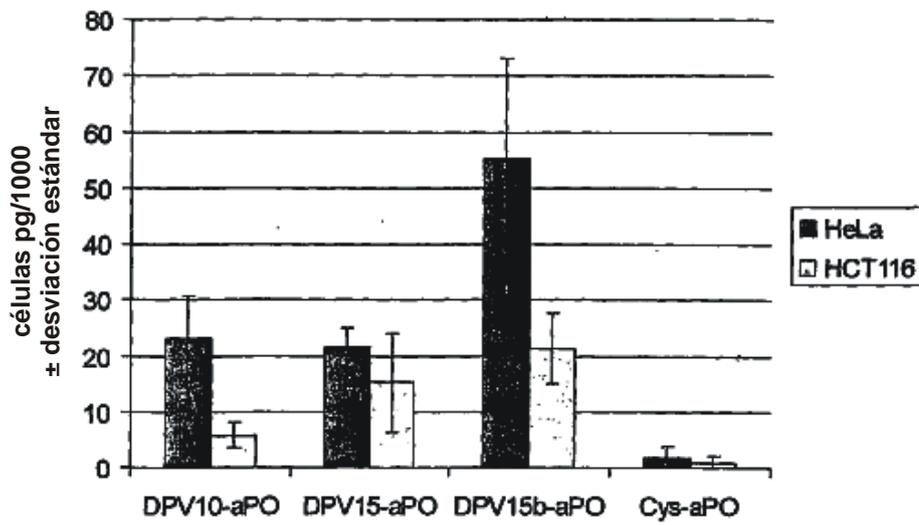


Figura 16

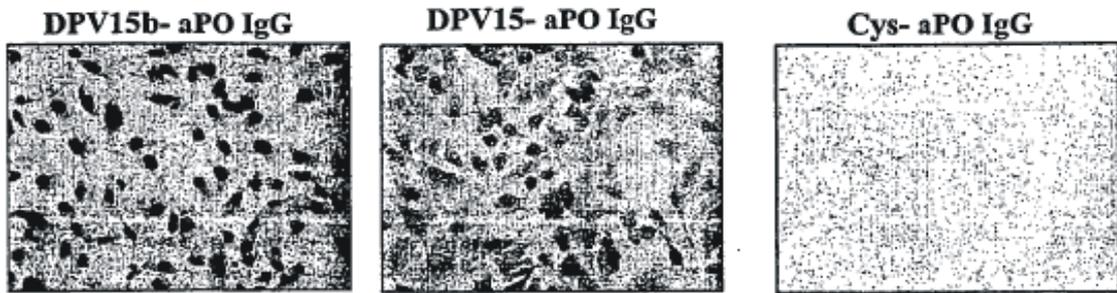


Figura 17

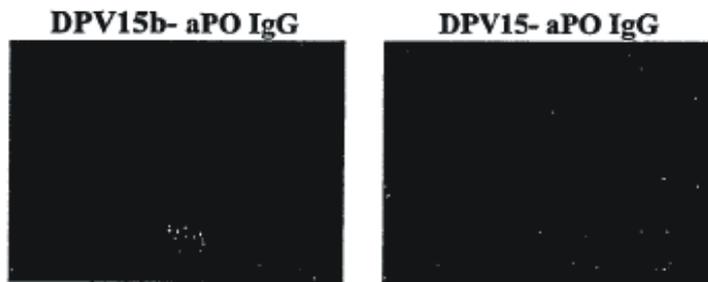


Figura 18

DPV15b-antiPO IgG



Figura 19

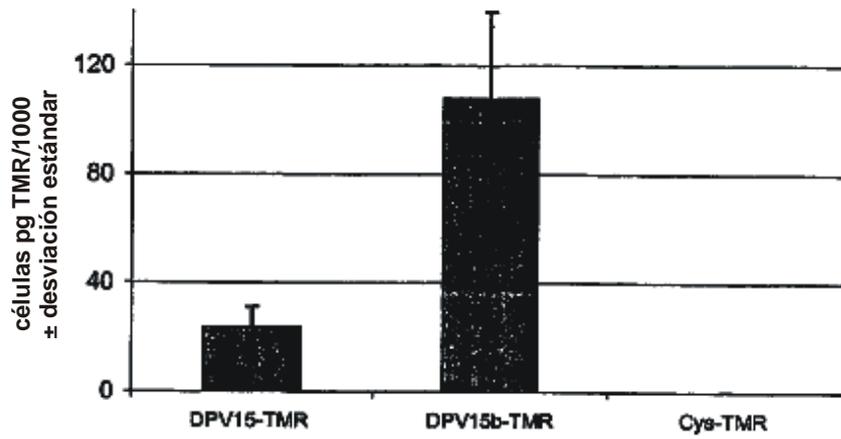


Figura 20

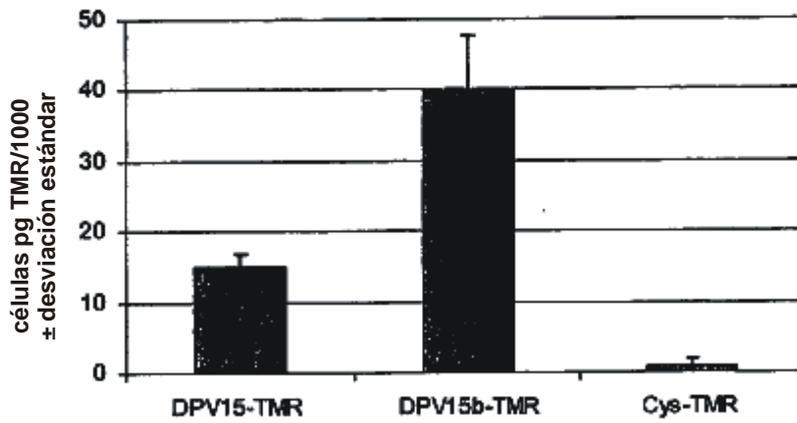


Figura 21

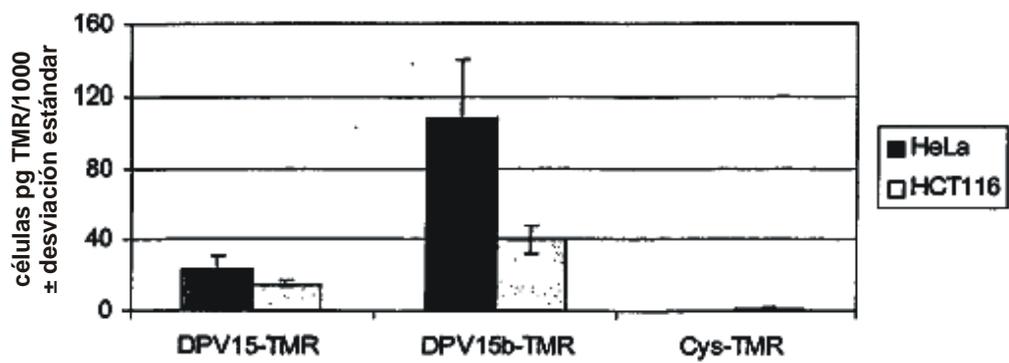


Figura 22

DPV15b-TMR



Figura 23

DPV15b-TMR

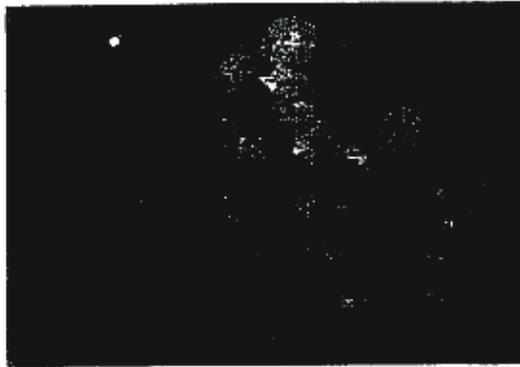


Figura 24

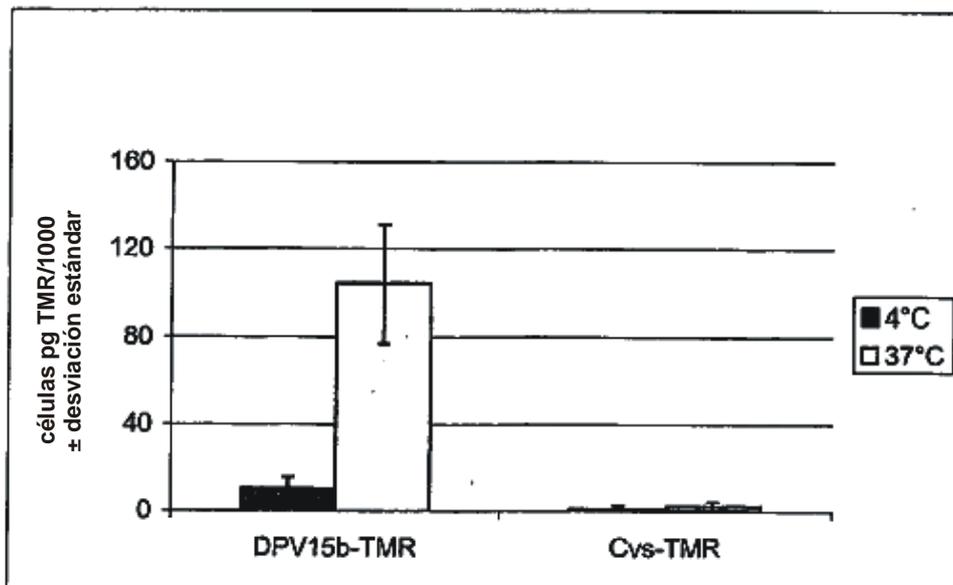


Figura 25

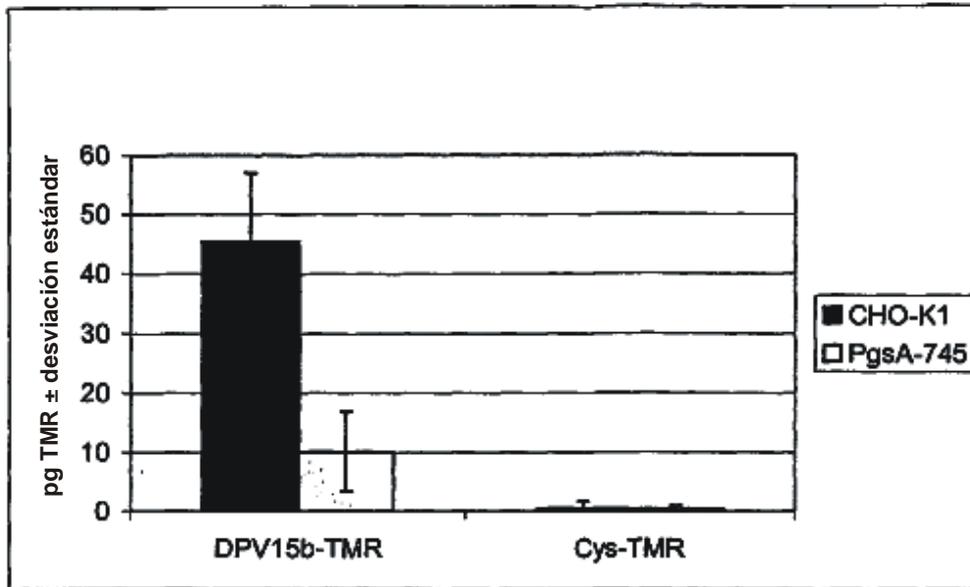


Figura 26

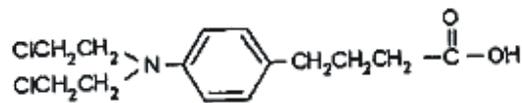


Figura 27

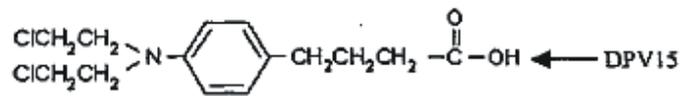


Figura 28

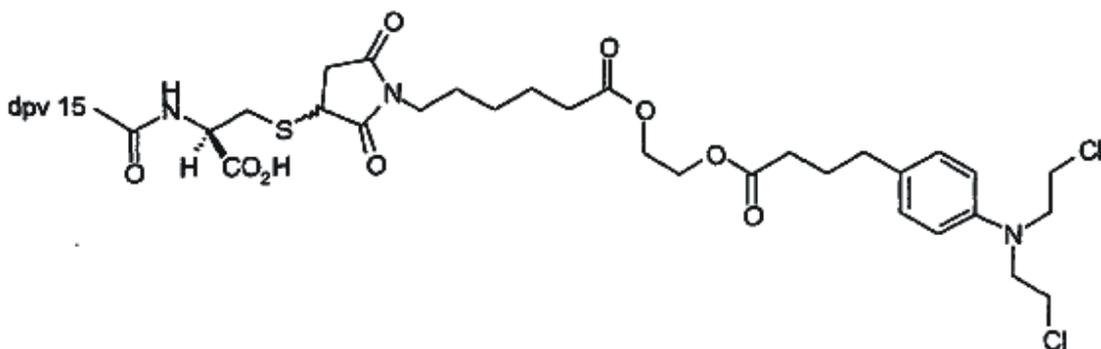


Figura 29

Figura 30

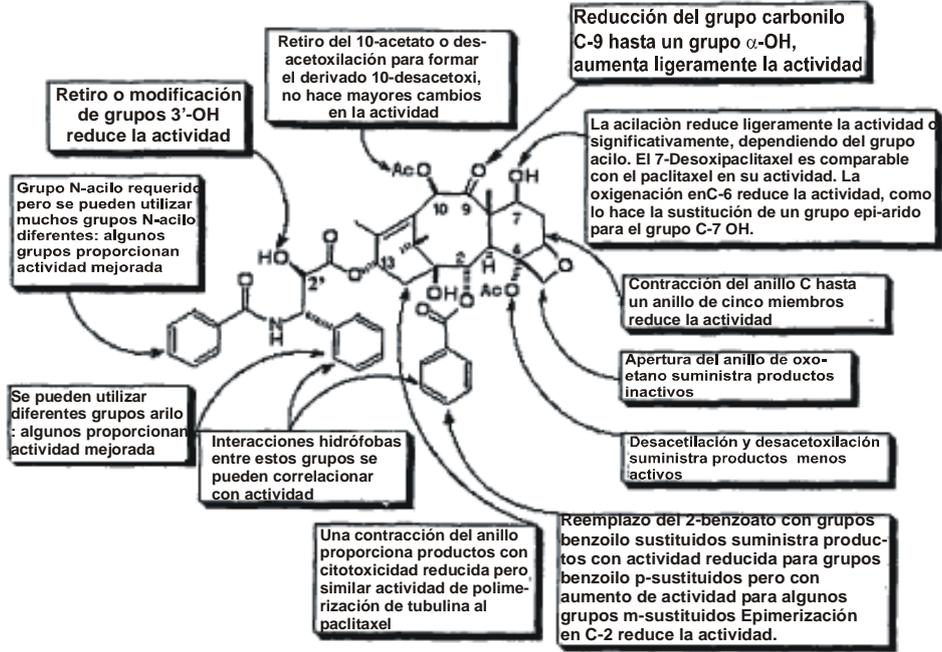
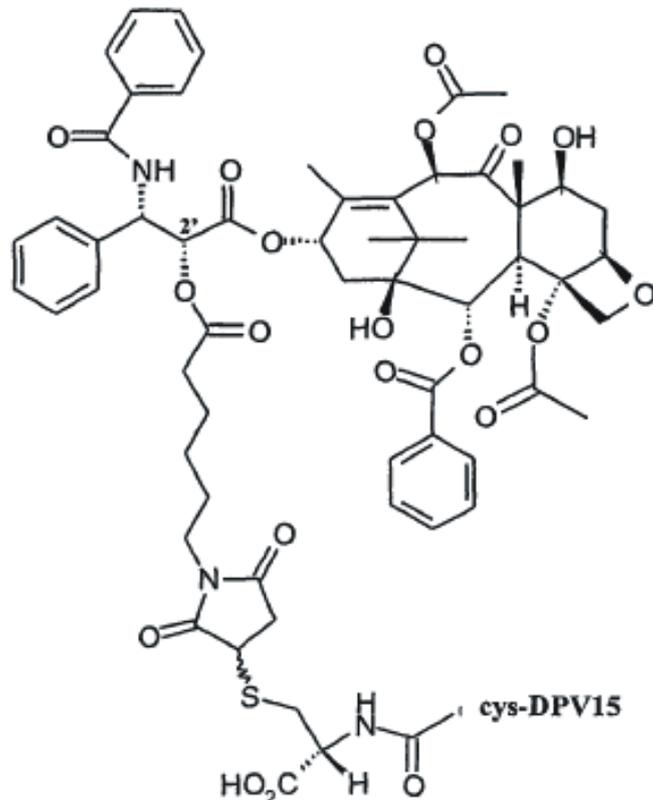


Figura 31



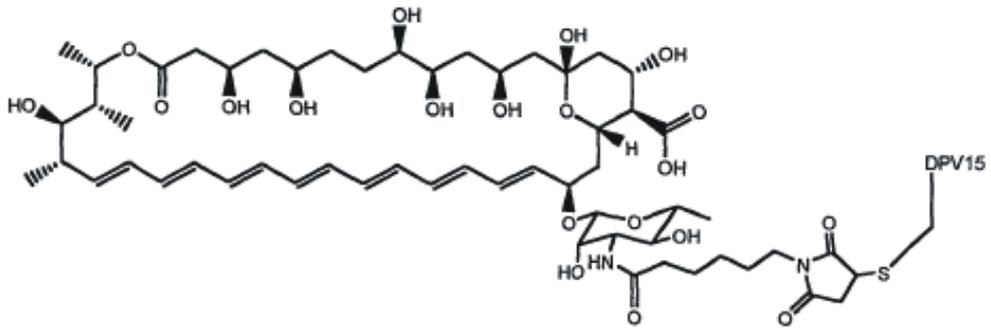


Figura 32

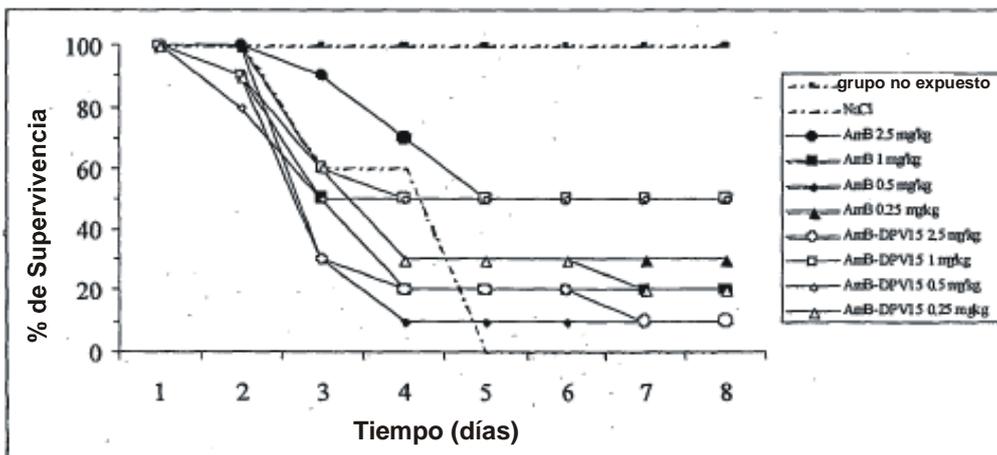


Figura 33

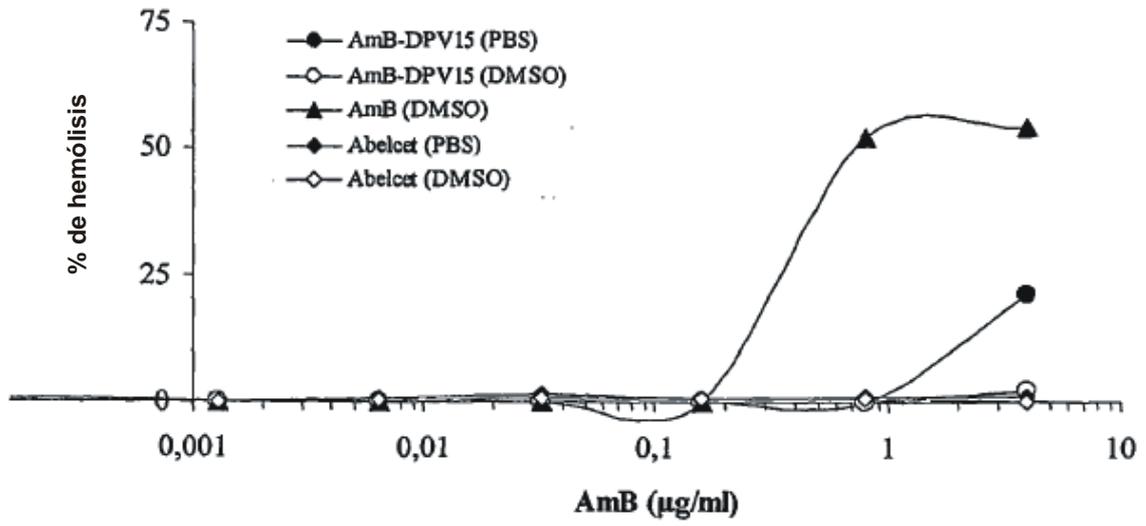


Figura 34

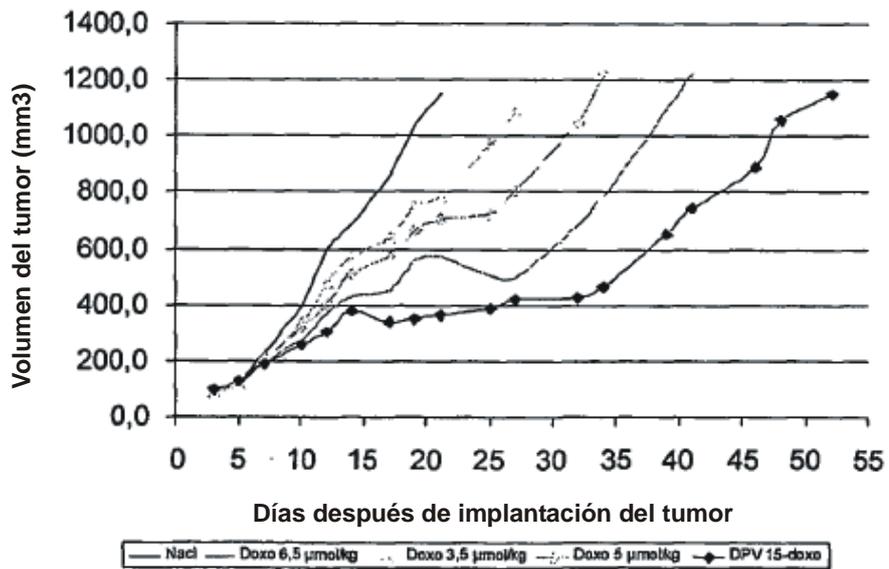


Figura 35

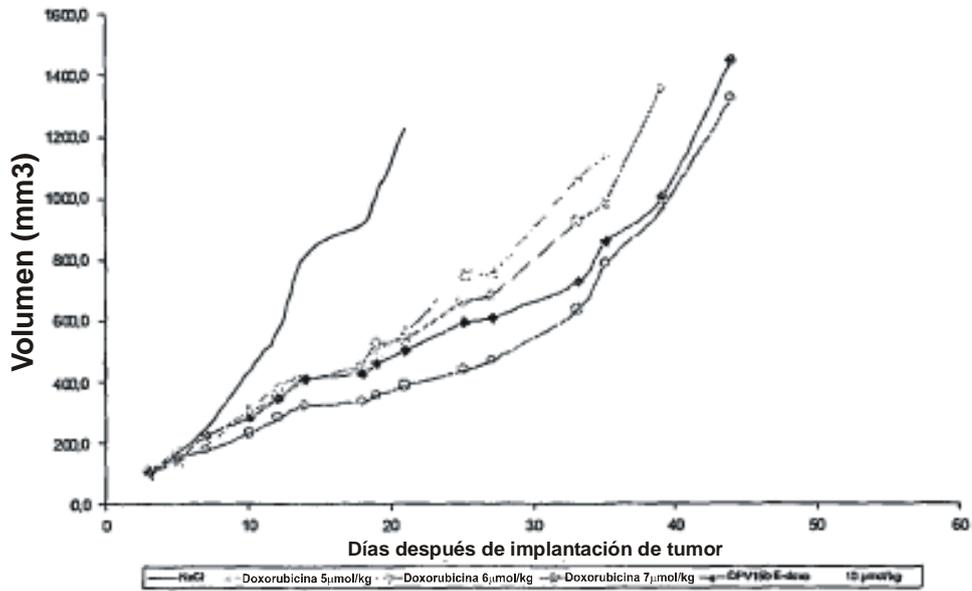


Figura 36

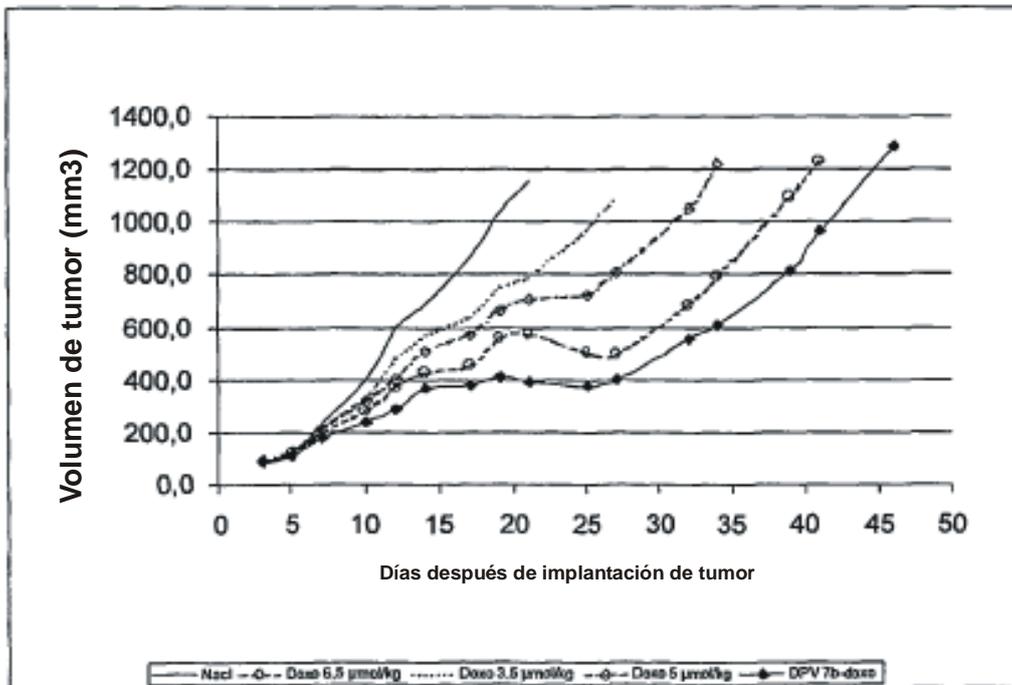


Figura 37

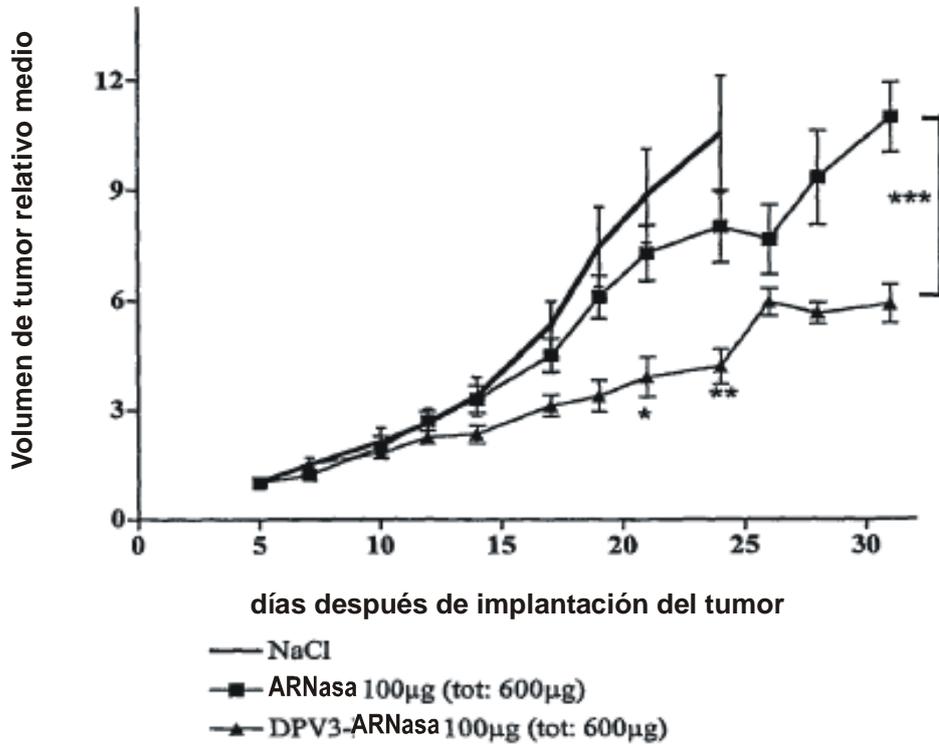


Figura 38

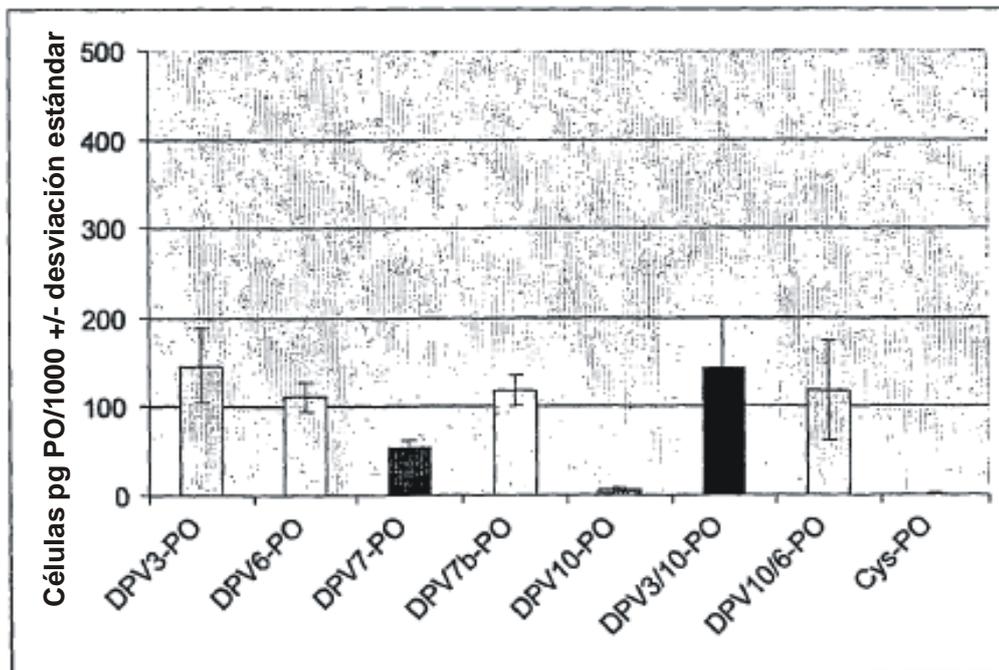


Figura 39

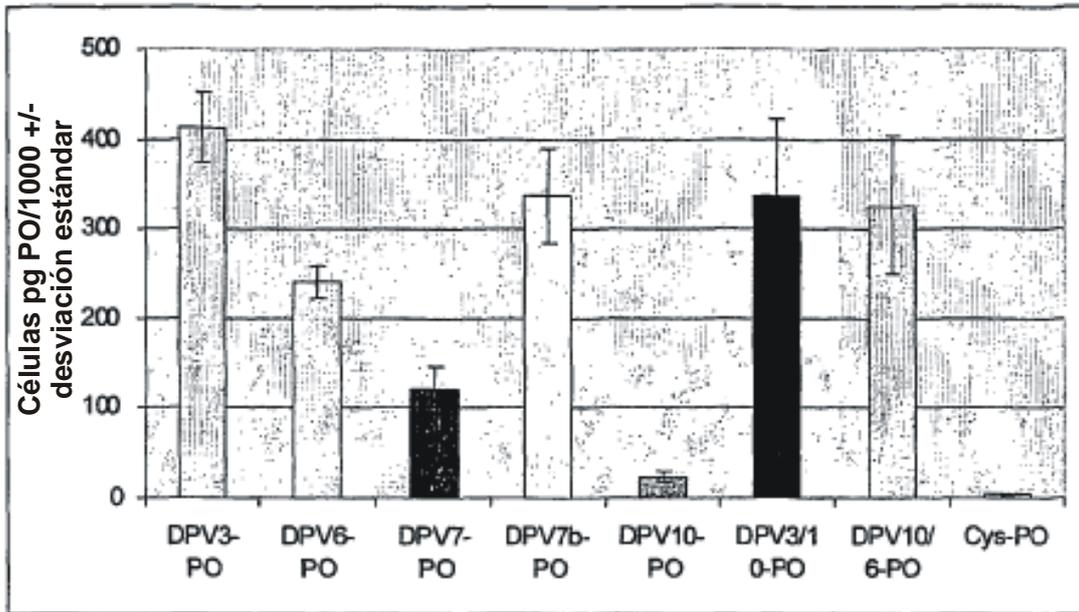


Figura 40

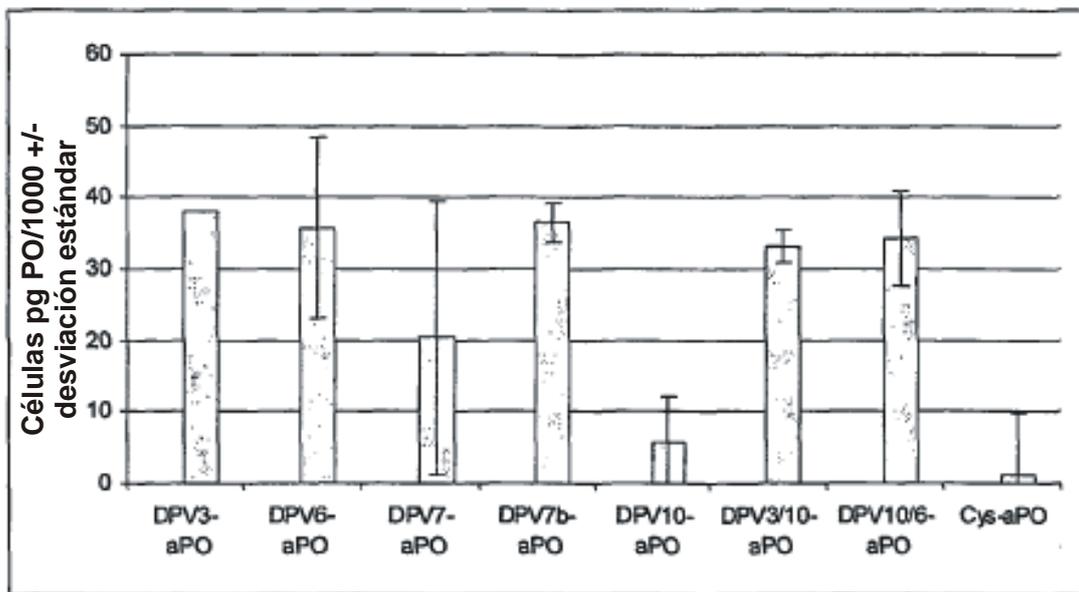


Figura 41

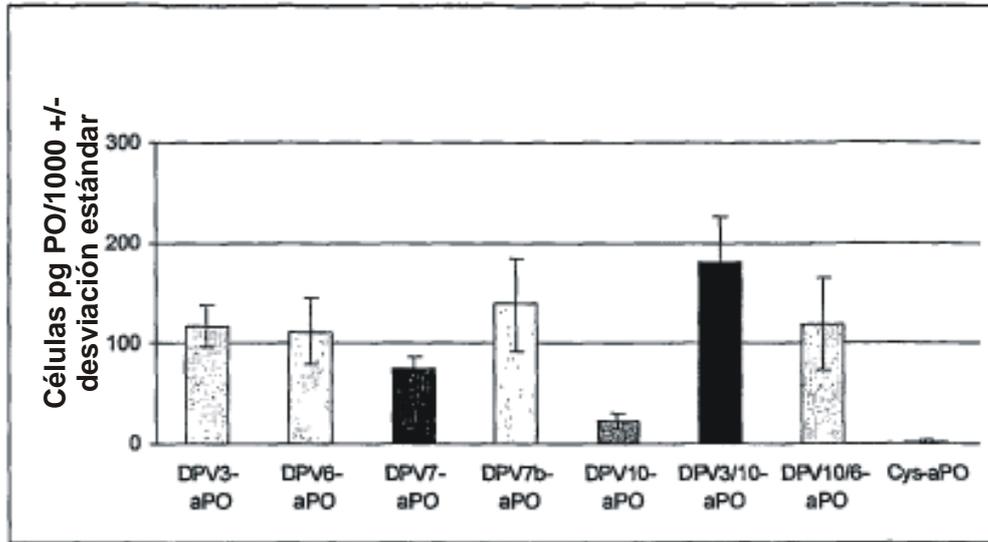


Figura 42

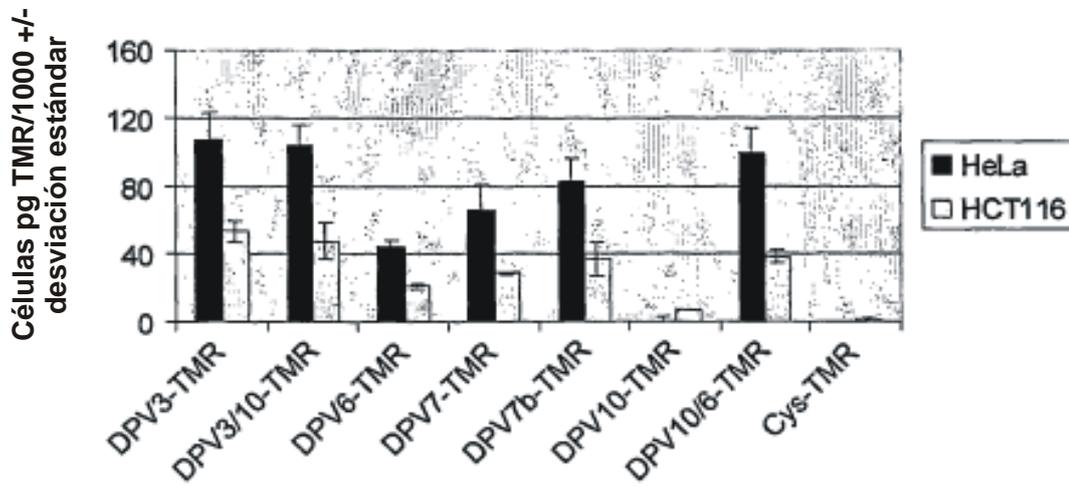


Figura 43