

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 267**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2006 E 06718899 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1846014**

54 Título: **Suministro selectivo de moléculas al interior de las células o marcación de células en zonas enfermas de tejidos usando un péptido transmembrana sensible a su entorno**

30 Prioridad:

**18.01.2005 US 644654 P**  
**20.12.2005 US 752238 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2013**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF GOVERNORS FOR HIGHER  
EDUCATION STATE OF RHODE ISLAND AND  
PROVIDENCE PLANTATIONS (100.0%)  
50 HOLDEN STREET  
PROVIDENCE, RI 02908, US**

72 Inventor/es:

**RESHETNYAK, YANA K.;  
ANDREEV, OLEG A.;  
LEHNERT, URSULA y  
ENGELMAN, DONALD M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 399 267 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

Suministro selectivo de moléculas al interior de las células o marcación de células en zonas enfermas de tejidos usando un péptido transmembrana sensible a su entorno.

### ANTECEDENTES DEL INVENTO

#### 5 1. Campo del invento

El presente invento tiene relación con el campo de la bioquímica de proteínas, la biofísica de membranas, el suministro específico de fármacos, la regulación génica, la obtención de imágenes y el diagnóstico de tejidos enfermos. Más particularmente, el invento se refiere al uso de un polipéptido transmembranal para dirigir a células y tejidos con ambiente ácido.

#### 10 2. Descripción de la técnica previa

Los compuestos terapéuticos y diagnósticos deben suministrarse al tejido enfermo y acumularse en él en concentraciones adecuadas para los fines terapéuticos o diagnósticos. El suministro específico de compuestos terapéuticos y diagnósticos a un tejido enfermo mejora significativamente la eficacia del tratamiento o la exactitud diagnóstica y reduce drásticamente los efectos secundarios. La hipoxia y la acidosis son marcadores fisiológicos de muchos procesos morbosos, tales como tumores, lesiones ateroscleróticas, isquemias, accidentes cerebrovasculares, inflamaciones y traumas (Stubbs et al., 2000, Mol. Med. Today 6, 15; Helmlinger et al., 2002, Clin. Cancer Res. 8, 1284; Izumi et al., 2003, Cancer Treat. Reviews 29, 541; Leake, 1997, Atherosclerosis 129, 149; Avkiran, 2003, J. Card. Surg. 18, 3). El suministro de moléculas, selectivo en cuanto al pH, al tejido enfermo es otro objeto del presente invento.

20 En la mayoría de los casos, los compuestos terapéuticos y diagnósticos se deben translocar a una célula a través de la membrana celular con objeto de alcanzar sus dianas. También es necesario que muchos reactivos para la investigación de procesos celulares y la regulación génica se transloquen a células. La membrana plasmática, que está principalmente compuesta de fosfolípidos y proteínas, es una barrera natural para la libre difusión de moléculas a través de ella.

25 Las funciones transmembranales son mediadas por proteínas de membrana. La plegadura y la inserción de grandes dominios de proteínas de membrana en las membranas requieren normalmente la participación activa de máquinas de translocación complejas (van den Berg et al., 2004, Nature 427, 36; Osborne et al., 2005, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21, 529; White y von Heijne, 2005, Curr. Opin. Struct. Biol. 15, 378), mientras que la inserción y la plegadura de secuencias proteicas cortas (< 50-60 restos) pueden tener lugar espontáneamente (von Heijne, 1994, FEBS Lett. 346, 69; Whitley et al., 1994, EMBO J. 13, 4653; Wimley y White, 2000, Biochemistry 39, 4432; Popot y Engelman, 1990, Biochemistry 29, 4031), liberándose energía y translocándose un extremo del polipéptido a la célula. En un trabajo reciente, se ha mostrado que ciertos casos de aparente inserción espontánea requieren una proteína de membrana, YidC [para una revisión, véase Dalbey y Kuhn, 2004, J. Cell. Biol. 166: 769].

35 Previamente se había comunicado que un polipéptido derivado de la hélice C de la bacteriorrodopsina, que consiste en la secuencia transmembranal y dos secuencias flanqueadoras, es soluble en disolución acuosa y se inserta espontáneamente a través de las bicapas lipídicas, formando una hélice alfa estable en un pH bajo (Engelman y Hunt, 1998, Patente de EE.UU. nº 5.739.273; Hunt et al., 1997, Biochemistry 36, 15.177). El péptido no presenta ningún elemento de estructura secundaria helicoidal en disolución ni en la membrana en un pH neutro. Puesto que el péptido se inserta en vesículas lipídicas puras, puede que no necesite YidC. La translocación de moléculas, selectiva en cuanto al pH, a través de la membrana celular es otro objeto del presente invento.

### SUMARIO DEL INVENTO

45 El presente invento proporciona un polipéptido de inserción en pH bajo [pHLIP (del inglés, pH Low Insertion Peptide)], con una secuencia predominantemente hidrófoba lo suficientemente larga para abarcar una bicapa lipídica de membrana en forma de hélice transmembranal, y secuencias que flanquean dicha secuencia hidrófoba de modo que el polipéptido es soluble en disoluciones acuosas y se inserta espontáneamente a través de una membrana de un modo dependiente del pH, moviéndose una de las regiones FS (FS<sub>in</sub>) a través de la membrana hasta el citoplasma y quedando la otra (FS<sub>out</sub>) fuera de la célula, expuesta al ambiente acuoso, en que dichas secuencias flanqueadoras comprenden una FS<sub>in</sub> en el extremo C de dicho polipéptido y una FS<sub>out</sub> en el extremo N de dicho polipéptido; y uno o más grupos funcionales fijados a dicho extremo C o dicho extremo N de dicho polipéptido, caracterizado por que el polipéptido comprende la Sec1:

AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTGG.

El invento también proporciona un método para suministrar in vitro un grupo funcional a través de una membrana celular en un pH extracelular ácido, empleando una composición que comprende el polipéptido pHLIP, en que un grupo funcional está fijado al extremo C del polipéptido.

También se proporciona un método para suministrar in vitro un grupo funcional a superficies celulares en un pH extracelular ácido, empleando una composición que comprende el polipéptido pHLIP, en que un grupo funcional está fijado al extremo N del polipéptido.

5 En un pH extracelular bajo, el pHLIP puede translocar ciertos grupos funcionales conjugados con la parte FS<sub>in</sub> del polipéptido a través de la membrana. Si los grupos funcionales están unidos al pHLIP mediante interacciones que son lábiles en el ambiente del citoplasma, tales como enlaces disulfuro, el grupo funcional puede ser liberado en el citoplasma. Los ejemplos de moléculas que pueden ser translocadas y liberadas incluyen faloidina, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs; del inglés, peptide nucleic acids) y el colorante dansilo.

10 El pHLIP puede anclar un grupo funcional, conjugado con la parte FS<sub>out</sub> del polipéptido, a una membrana celular en un pH bajo, situándolo en la superficie externa de una célula. La situación en la superficie externa puede ser útil, por ejemplo, para estimular actividades de receptor, para formar una imagen de la situación de la célula marcada, o para suministrar moléculas tóxicas tales como la toxina diftérica para matar selectivamente células en regiones de bajo pH.

15 El pHLIP representa una nueva tecnología para un suministro rápido, selectivo y eficaz de grupos funcionales a células in vitro e in vivo.

Éstas y otras características del presente invento se describirán ahora con mayor detalle, con referencia a los dibujos adjuntos.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

20 La FIGURA 1 es un diagrama esquemático del suministro de un grupo funcional a una célula mediante pHLIP (a) o del anclaje de un grupo funcional a la superficie de una célula diana mediante pHLIP (b).

25 Las FIGURAS 2a y 2b son gráficos de tiempo frente a intensidad de fluorescencia, en que en (a) se añadió ditionito sódico a pHLIP con NBD sobre FS<sub>out</sub>, insertados en vesículas unilaminares grandes (LUVs; del inglés, large unilame-llar vesicles) de POPC, y en (b) se añadieron LUVs de POPC que contenían dentro ion ditionito al NBD-péptido en un pH de 8,0, disminuyendo luego la inserción del péptido en liposomas desencadenada por el pH, lo que ilustra el proceso de marcación de células en un pH bajo.

La FIGURA 3a muestra la estructura química covalente del colorante dansilo y la FIGURA 3b muestra imágenes de fluorescencia de células HeLa incubadas (durante 15 minutos) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-dansilo (7 µM) en pHs de 5,5, 6,5, 7,0 y 7,4, y lavadas con tampón de PBS en un pH de 7,4, en que el enlace S-S es con FS<sub>in</sub>, y el colorante es liberado en las células de un modo dependiente del pH.

30 La FIGURA 4a muestra la estructura química covalente de la faloidina y la FIGURA 4b muestra imágenes de fluorescencia de células HeLa incubadas (durante 15 minutos) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (4 µM) en un pH de 7,4 (izquierda) y 6,5 (derecha), en que la faloidina está unida a FS<sub>in</sub> y es liberada en el citoplasma tras la inserción y la subsiguiente reducción del enlace disulfuro.

35 Las FIGURAS 5a-5d son gráficos de fluorescencia frente a cuentas de células no tratadas y células tratadas en suspensión (durante 1 hora) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (6 µM) en diferentes pHs y temperaturas, mostrando la marcación de células de un modo dependiente del pH que no es inhibida por una baja temperatura (4 °C).

40 La FIGURA 6a muestra imágenes confocales de fluorescencia y campo claro de células de adenocarcinoma de mama JC incubadas (durante 1 hora) con una construcción no escindible de pHLIP-faloidina-TRITC que tenía la faloidina-TRITC sobre FS<sub>in</sub>, en concentración 1 µM, en un pH de 6,5 (derecha), y la FIGURA 6b es de imágenes de fluorescencia de células de adenocarcinoma de mama JC incubadas con la misma construcción no escindible de pHLIP-faloidina-TRITC en un pH de 6,5 y con diferentes aumentos (40x y 100x).

45 Las FIGURAS 7a-7c son imágenes de células Hela, células de cáncer de mama JC y células de cáncer de próstata TRAMP-C1 con filamentos de actina fluorescentes, que demuestran el transporte de faloidina-TRITC y su liberación en el citoplasma.

50 La FIGURA 8a es un gráfico de barras sobre la concentración de péptido frente a la viabilidad celular y la FIGURA 8b son gráficos de barras sobre la concentración de péptido para tratamiento de células frente a la fluorescencia de agentes que no atraviesan la membrana: SYTOX-Orange para tinción nuclear (0,5 µM) (columnas claras) y faloidina-TRITC (2 µM) (columnas oscuras), incubados en dos pHs diferentes con células tratadas con péptido; las células no tratadas se consideran el 100%, lo que muestra que el péptido presenta una citotoxicidad mínima.

La FIGURA 9 muestra imágenes fluorescentes de cuerpo completo de hembras de ratón desnudo atímico que portan tumores con un tamaño de 3 mm, 4 horas (a) y 24 horas (b) después de la inyección de 100 µl de Cy5.5 solo y Cy5.5 unido covalentemente al resto de Cys del extremo N del pHLIP, en concentración 50 µM, lo que muestra que el péptido se localiza en el tumor.

La FIGURA 10 muestra imágenes fluorescentes de cuerpo completo de hembras de ratón desnudo atímico que portan tumores de 3 mm, 24 horas después de la inyección de 100  $\mu$ l de Cy5.5-pHLIP en concentración 50  $\mu$ M (1 mg/kg).

5 La FIGURA 11a muestra imágenes, por contraste de fase, de células HeLa incubadas (durante 1 hora) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (1  $\mu$ M) antes y después del tratamiento con una disolución de disociación en diferentes pHs, y la FIGURA 11b muestra imágenes de fluorescencia de núcleos teñidos con DAPI 0,5  $\mu$ M y las correspondientes imágenes, por contraste de fase, de las células HeLa multinucleadas 48 horas después de una incubación (1 hora) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (1  $\mu$ M).

10 La FIGURA 12 muestra imágenes, de fluorescencia y contraste de fase, de las mismas células HeLa incubadas (durante 1 hora) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (2  $\mu$ M), tomadas antes (izquierda) y 5 minutos después de la adición de una disolución de disociación (derecha).

La FIGURA 13 muestra imágenes, de fluorescencia y contraste de fase, de células HeLa tratadas con una construcción escindible de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA en una concentración 1  $\mu$ M, con el S-S sobre FS<sub>in</sub>, en unos pHs de 7,4 y 6,5, que muestran el suministro del PNA a las células.

15 La FIGURA 14 muestra imágenes, de fluorescencia y contraste de fase (aumento de 100x), de células HeLa tratadas con la construcción escindible de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA (1  $\mu$ M) en unos pHs de 7,4 y 6,5.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO**

20 Se ha comunicado previamente que un polipéptido procedente de la hélice C de la bacteriorrodopsina, consistente en la secuencia transmembranal y dos secuencias flanqueadoras, es soluble en disolución acuosa y se inserta espontáneamente a través de bicapas lipídicas para formar una hélice alfa estable en un pH bajo (Engelman y Hunt, 1998, Patente de EE.UU. n° 5.739.273; Hunt et al., 1997, Biochemistry 36, 15.177). La inserción es conducida por la protonación de restos de Asp situados en la parte transmembranal del polipéptido.

25 El presente invento presenta ese polipéptido, pHLIP, de secuencia: AAEQNPIYWARYADWLFT TPLLLLDLALLVDA-DEGTCG (SEC 1), con una secuencia predominantemente hidrófoba lo suficientemente larga para abarcar una bicapa lipídica de membrana en forma de hélice transmembranal y que comprende uno o más grupos disociables que proporcionan y translocan selectivamente in vitro e in vivo compuestos a células con ambiente extracelular bajo, como se muestra en la FIGURA 1. La Figura 1 es un diagrama esquemático del suministro de un grupo funcional a una célula (a) o del anclaje de un grupo funcional a la célula diana (b). En un pH fisiológico, el producto de conjugación de péptido-grupo funcional interacciona débilmente con una membrana. En un pH bajo, el péptido forma una hélice transmembranal con un extremo insertado en el citoplasma. La escisión del enlace entre el péptido y el grupo funcional libera éste dentro de la célula.

### **Topología de la inserción**

35 Para identificar la topología de la inserción del pHLIP, se utilizó un ensayo establecido que se basa en la aplicación del ion ditionito ( $S_2O_4^{2-}$ ), que no atraviesa membranas, que puede modificar químicamente el fluoróforo NBD y sofocar su fluorescencia (Chattopadhyay, 1990, Chem. Phys. Lipids 53, 1).

40 Se insertó pHLIP marcado, en liposomas de POPC. La topología del pHLIP en una bicapa lipídica fue determinada utilizando la reacción de sofocación de NBD-ditionito. Se determinó a 530 nm la señal de fluorescencia del NBD unido al extremo N del péptido, usando una excitación a 470 nm. La posición máxima del espectro de fluorescencia de NBD del péptido marcado e insertado en liposomas fue 530 nm, lo que indica que el fluoróforo NBD está rodeado por un ambiente polar (con una constante dieléctrica de  $\sim 70$ , por comparación, la posición máxima del espectro de NBD-PE, donde el NBD está situado a nivel del grupo fosfato, es 522 nm). La adición del ion ditionito condujo a la sofocación completa de la fluorescencia del NBD (Figura 2a). Una segunda población de liposomas con ditionito encerrado dentro de ellas fue mezclada en un pH neutro con el péptido marcado, y luego se redujo el pH para desencadenar la inserción del péptido. No se detectó cambio alguno en la señal de fluorescencia (Figura 2b), lo que mostraba que el ditionito encerrado en los liposomas no reaccionaba con el NBD, y mostraba que el extremo N del péptido está situado fuera del liposoma y que el péptido no provoca la fuga de ditionito por la membrana. En la Figura 2a, se añadió ditionito sódico al NBD-péptido insertado en LUVs de POPC. En la Figura 2b, se añadieron LUVs de POPC que contenían dentro ion ditionito al NBD-péptido en un pH de 8,0; la disminución posterior del pH desencadenó la inserción del péptido en los liposomas. Se usó Triton para la rotura de los liposomas. La concentración del péptido utilizado en los experimentos fue 7  $\mu$ M. Se observó sofocación del NBD después de la rotura de la membrana mediante Triton. Estos datos demuestran que, en un pH bajo, el extremo N está situado fuera y, en consecuencia, el extremo C está situado dentro de los liposomas de POPC.

### Translocación, dependiente del pH, de una molécula a través de la membrana celular

Se examinó pHLIP conjugado con colorante dansilo por medio de un enlace disulfuro (Figura 3a), en cuanto al suministro del colorante a células HeLa vivas en diferentes pHs (Figura 3b). Las células fueron incubadas, durante 15 minutos en un pH de 5,5, 6,5, 7,0 ó 7,4, con el péptido fluorescentemente marcado y fueron luego lavadas en un pH de 7,4 para eliminar todo péptido reversiblemente unido. La incorporación de dansilo fue significativamente mayor en un pH bajo. Las incorporaciones relativas fueron 18%, 48%, 78% y 100% en los pHs de 7,4, 7,0, 6,5 y 5,5, respectivamente. El dansilo solo no penetra en las células.

### Translocación de una molécula y liberación de la misma dentro de una célula en un pH bajo

Para examinar la capacidad del pHLIP para translocar péptidos a través de la membrana celular, se escogió un péptido cíclico soluble en agua, la faloidina, procedente del hongo *Amanita phalloides*. La faloidina se une íntimamente a filamentos de actina en una concentración nanomolar e inhibe fuertemente su despolimerización (Weiland et al., 1977, Curr. Probl. Clin. Biochem. 7, 11; Wehland et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5613), pero no afecta normalmente a las células ya que es demasiado polar para atravesar una membrana. Se utiliza comúnmente faloidina fluorescente para marcar filamentos de actina en células permeabilizadas. Los filamentos de actina teñidos con faloidina fluorescente presentan un patrón filamentoso fácilmente reconocible que no puede ser confundido con la tinción de las otras estructuras, orgánulos o membranas celulares. Por lo tanto, el suministro de faloidina fluorescente a células vivas mediante pHLIP puede ser fácilmente verificado por microscopía de fluorescencia. Se conjugó faloidina fluorescentemente marcada (faloidina-TRITC), por medio de un enlace S-S, con el extremo C de pHLIP usando un agente entrecruzante bifuncional. Las células fueron incubadas con una construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC en diferentes pHs y fueron posteriormente lavadas con una disolución de medio para cultivo celular, pH de 7,4. Se esperaba que la penetración del extremo C en el ambiente reductor del citoplasma escindiera el enlace S-S y liberara faloidina-TRITC. En un pH bajo, se observó una tinción fluorescente brillante de filamentos de actina, mientras que, en un pH fisiológico, se observó cierta tinción fluorescente de membranas pero no del citoesqueleto (Figura 4). El tratamiento de las células con faloidina-TRITC o agente entrecruzante-faloidina-TRITC en presencia o ausencia de péptido no produjo tinción fluorescente de filamentos de actina en pHs de 6,0-7,4. La fluorescencia era muy débil después de una incubación en un pH de 7,4 y se localizaba en la membrana plasmática. Después de una incubación en un pH de 6,5, se observó una intensa fluorescencia de filamentos de actina.

### Cuantificación de la incorporación

Se usó la técnica FACS para cuantificar la translocación de la faloidina fluorescente, dependiente del pH, por el péptido a través de las membranas de células HeLa en suspensión. Como se muestra en la Figura 5, la translocación de la faloidina fluorescente depende del pH y no implica endocitosis. Se muestra la citofluorometría de células Hela tratadas (durante 1 hora) con la construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (6  $\mu$ M) en un pH de 7,4 y T = 37 °C (b), pH de 6,5 y T = 37 °C (c) y pH de 6,5 y T = 4 °C (d). Se muestran las células no tratadas (a). Las células tratadas con pHLIP-S-S-faloidina-TRITC en un pH de 7,4 presentaban un nivel muy bajo de fluorescencia. Sin embargo, en un pH bajo se observó una población de células muy fluorescentes. La eficacia del suministro a 4 °C fue la misma que a 37 °C, lo que muestra que no está implicada la endocitosis en el mecanismo de incorporación.

Las células tratadas con pHLIP-S-S-faloidina-TRITC presentaban un nivel muy bajo de fluorescencia a causa de una fijación muy limitada a la membrana en un pH de 7,4. Sin embargo, en un pH bajo se observó una población de células muy fluorescentes (Figura 5c). La eficacia del suministro de faloidina-TRITC a células por pHLIP a baja temperatura fue la misma que a 37 °C (Figura 5d), lo que proporciona evidencia adicional de que el mecanismo de translocación no es la endocitosis. La aparición de poblaciones discretas de células fluorescentes podría reflejar una diferencia en el suministro de faloidina-TRITC, desde una variación de la capacidad reductora citoplásmica de las células en diferentes fases del ciclo celular (Conour, 2004, Physiol. Genomics 18, 196) hasta la eliminación con el péptido durante el lavado celular en un pH de 7,4, ya que la inserción del péptido es reversible. La liberación de faloidina-TRITC dentro de la célula depende de la concentración de glutatión, de la que se sabe que varía significativamente durante el ciclo celular, alcanzando un máximo en G2/M y un mínimo en G1 (Conour, 2004, Physiol. Genomics 18, 196). Puesto que el tiempo de incubación (1 hora) es mucho menor que el tiempo del ciclo de las células HeLa (18 horas), las células que pudieran estar en G2/M podrían incorporar más faloidina que las demás. Se han evitado incubaciones prolongadas de células con péptido-faloidina para minimizar la exposición de las células a un pH bajo, especialmente a temperatura baja.

### Mecanismo de la translocación de moléculas a través de la membrana mediante pHLIP

Para demostrar que el propio péptido no entra en la célula, se explotó el hecho (previamente comunicado por Hunt et al., 1997, Biochemistry 36, 15.177) de que un aumento del pH conduce a la inversión de la inserción y a la liberación del péptido desde las bicapas lipídicas. Se conjugó faloidina-TRITC con el extremo C del péptido por medio de un enlace covalente no escindible, se incubó con células en un pH de 6,5 y se lavó con tampón de PBS con el mismo pH (Figura 6a, izquierda, incubación durante 1 hora con la construcción no escindible de pHLIP-faloidina-TRITC, 1  $\mu$ M, en un pH de 6,5, derecha). La Figura 6b es de imágenes de fluorescencia de células de adenocarcinoma de mama JC incubadas en un pH de 6,5 con la construcción no escindible de pHLIP-faloidina-TRITC, con diferentes

5 aumentos (40x y 100x), que demuestran la falta de tinción de los filamentos de actina; sin embargo, hubo tinción de la membrana plasmática. Las células fueron luego lavadas con el tampón en un pH de 7,4, lo que dio lugar a la separación del péptido junto con faloidina-TRITC, y sólo se observaron cantidades mínimas de fluorescencia (Figura 6a). Se repitieron estos procedimientos con el péptido conjugado con rojo Texas y rodamina (datos no mostrados), con resultados similares. Los experimentos demuestran de nuevo que el mecanismo de translocación no implica la vía endocítica ya que el pHLIP permanece fijado a la membrana celular en un pH bajo y puede ser separado por lavado en un pH neutro.

10 También se examinó el suministro de faloidina unida a pHLIP mediante un enlace S-S, a diferentes líneas celulares: células Hela humanas, células de cáncer de próstata TRAMP-C1 de ratón y células de cáncer de mama JC de ratón. En cada caso, en que se incubaron las células durante 1 hora con la construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (0,5 - 1  $\mu\text{M}$ ) en un pH de 6,5 y luego se realizó un lavado con PBS en un pH de 7,4, se observó la tinción característica de los filamentos de actina en un pH < 7,0 (Figura 7). Esto demostró que la translocación de moléculas mediante pHLIP no depende de la presencia de receptores en tipos particulares de células.

### Prueba de citotoxicidad y de fugas en la membrana

15 Se investigó la citotoxicidad del péptido y su capacidad para provocar fugas en la membrana. En las Figuras 8a y 8b se muestran las pruebas de toxicidad celular y de fugas en la membrana. La incubación de células HeLa con el péptido en concentraciones de hasta 16  $\mu\text{M}$  durante 24 horas bajo condiciones fisiológicas no afecta a la viabilidad celular (Figura 8a). Se examinaron las fugas en la membrana mediante la incubación de células HeLa con el péptido en diferentes concentraciones (hasta 10  $\mu\text{M}$ ) en pHs de 7,4 y 6,5 durante 1 hora, seguida de la adición de agentes que no penetran en las células: faloidina-TRITC y SYTOX-Orange para tinción nuclear. No se observó incremento alguno en la incorporación de faloidina-TRITC ni SYTOX-Orange a las células tratadas con el péptido en pHs de 6,5 y 7,4 (Figura 8b). La incorporación de faloidina-TRITC o SYTOX-Orange fue 10 veces menor que la incorporación a células tratadas con Triton, que se usa para la permeabilización de membranas celulares. De este modo, como en el caso de los liposomas, el péptido no provocó la formación de poros.

### 25 Estudio sobre toxicidad

Se llevó a cabo un estudio preliminar sobre toxicidad. Se administraron 100  $\mu\text{l}$  de péptido en concentración 150  $\mu\text{M}$ , en forma de una sola inyección en la vena caudal, a 4 hembras de ratón C3D2F1 y 4 machos de ratón C57/B1. La concentración final fue 4 mg/kg. Un veterinario observó a los ratones el día después de la inyección y durante las 6 semanas siguientes. En ningún ratón se observaron cambios fisiológicos ni de comportamiento.

### 30 La acumulación del pHLIP en un tumor *in vivo*

Para estudiar la distribución de pHLIP *in vivo*, se inyectó colorante fluorescente Cy5.5 del infrarrojo cercano, covalentemente unido al pHLIP, a ratones que portaban un tumor y se llevó a cabo la obtención de imágenes de fluorescencia de cuerpo completo. Se originó el tumor MDA-MB-231 humano mediante la inyección de células tumorales ( $2 \times 10^7$  células/ijada/0,2 ml) en la ijada derecha de hembras adultas de ratón atómico desnudo. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de 3 mm de diámetro, se administraron 100  $\mu\text{l}$  de Cy5.5 solo o Cy5.5 covalentemente unido al pHLIP, en una concentración 50  $\mu\text{M}$ , en forma de una sola inyección en la vena caudal. Se llevó a cabo la obtención de imágenes inmediatamente, después de 1, 2 y 4 horas, y al día siguiente después de 24 horas (Figuras 9 y 10). El colorante y el péptido-colorante se acumularon en el hígado y el riñón, los órganos que normalmente absorben rápidamente cualquier compuesto. Las relaciones de (hígado + riñón)/tumor fueron 5,9 y 3,6 en los ratones a los que se inyectó colorante solo y pHLIP-colorante: acumulación para ratones. Las imágenes muestran claramente que el péptido-colorante se acumulaba en el tumor en una concentración que es suficiente para que se lleve a cabo la obtención de imágenes (Figura 10). La acumulación de pHLIP-Cy5.5 en el tumor era 1,6 veces mayor que la acumulación de colorante solo. Las relaciones de (hígado + riñón)/tumor fueron 1,6 y 2,6 para pHLIP-Cy5.5 y Cy5.5 solo, respectivamente. Esto sugiere que el contraste del tumor era mucho mejor con el péptido.

## 45 MÉTODOS

### Síntesis del péptido y de construcciones de péptido-cargamento

50 Se preparó pHLIP mediante síntesis peptídica en fase sólida usando la química estándar de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) y se purificó mediante cromatografía en fase inversa (en una columna C18) en el W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory de la Universidad de Yale. En una preparación típica de la forma soluble del péptido, se disolvió el polvo liofilizado en una disolución que contenía urea 6 M y se transfirió la disolución al tampón de trabajo usando una columna G-10 para exclusión por tamaños mediante centrifugación. La concentración del péptido fue determinada por absorbancia ( $\epsilon_{280} = 13.940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y fue confirmada mediante un análisis cuantitativo de aminoácidos. El péptido fue marcado por su único resto de cisteína C-terminal con dansilo, rojo Texas o Rodamina mediante incubación con didansilo (Sigma), rojo Texas-maleimida (Molecular Probes) o tetrametilrodamina-maleimida (Molecular Probes) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM, urea 6 M, pH de 8,0, en la oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Los péptidos conjugados fueron purificados en una columna G-10 para exclusión por tamaños y fueron transferidos a tampón de PBS, pH de 7,4. La concentración del péptido marcado fue determinada por absorbancia (dansilo:  $\epsilon_{340} = 4.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; rojo Texas:  $\epsilon_{582} = 112.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; rodamina:  $\epsilon_{542} = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Se conjugó pHLIP con faloidina-rodamina (faloidina-TRITC; Sigma) usando agentes fotoentrecruzantes bifuncionales: S-[2-(4-azidosalicilamido)etil]tiopiridina (AET; Molecular Probes) o benzofenona-4-yodoacetamida (Molecular Probes). El primer agente entrecruzante (AET) forma un enlace S-S con el extremo C del péptido y se une a faloidina-TRITC bajo irradiación UV (pHLIP-S-S-faloidina-TRITC). El segundo agente entrecruzante se usó para la síntesis de la construcción no escindible (pHLIP-faloidina-TRITC). Se incubó pHLIP con el agente entrecruzante en PBS a 4 °C, en la oscuridad, durante 24 horas. Se eliminó el agente entrecruzante en exceso usando una columna G-10 para exclusión por tamaños mediante centrifugación. Se añadió faloidina-TRITC en un exceso 5x molar al pHLIP-agente entrecruzante y se irradió a 340 nm durante 30 minutos. La faloidina-TRITC sin reaccionar se eliminó usando una columna G-10 para exclusión por tamaños. La concentración de rodamina fue determinada por absorción a 542 nm ( $\epsilon_{542} = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Separadamente, se conjugó faloidina-TRITC con AET sin péptido. La conjugación de faloidina-TRITC con agente entrecruzante o pHLIP no afectó a su capacidad para unirse a actina F (datos no mostrados).

El ácido nucleico peptídico TAMRA-o-o-CATAGTATAAGT-o-Cys-NH<sub>2</sub> con Cys y colorante fluorescente, TAMRA, fue sintetizado por Applied Biosystems, Massachusetts, EE.UU. Este PNA se dirige al mRNA de MDM2 (Shiraishi y Nielsen, 2004, Nucleic Acids Res. 32, 4893). Se incubó el PNA-TAMRA con pHLIP en un exceso molar del cuádruple durante 24 horas en PBS, pH de 7,4, a 4 °C. La construcción de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA fue purificada en una columna G-10. La concentración se determinó midiendo la absorción a 546 nm ( $\epsilon_{542} = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### Preparación de liposomas

Se prepararon vesículas unilaminares grandes (LUVs) por sonicación. Se disolvió el fosfolípido POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolcolina; Avanti Polar Lipids, Inc.) en cloroformo. Después de la eliminación del disolvente usando un rotavapor, la película de fosfolípido fue secada durante la noche y fue luego rehidratada en Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM, pH de 8,0, y agitada con formación de remolinos. La suspensión fue sometida a sonicación usando un ultrasonificador Branson de punta de titanio hasta que la disolución se volvió transparente. La distribución de los liposomas se evaluó por dispersión lumínica dinámica. El radio de las vesículas era  $72,6 \pm 4,6$  nm (la polidispersidad fue  $13,6 \pm 6,7\%$ ). Para preparar liposomas con ditionito dentro de ellas, la película de fosfolípido fue rehidratada en tampón de Tris 1 M, pH de 8,0, que contenía ditionito 1 M. El ditionito no atrapado fue eliminado de la disolución de liposomas usando un casete de diálisis con poros con un corte de 10 kDa. La diálisis se llevó a cabo frente a Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM, pH de 8,0, durante 4 horas con cambios horarios de disolución.

### Detección de la topología peptídica

La adición externa de ditionito (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) a las LUVs sofoca químicamente la fluorescencia del NBD en las hojas externas de las bicapas. El péptido fue marcado por el extremo N con NBD mediante incubación con NBD-Cl (Molecular Probes) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM, pH de 7,0, en oscuridad a 4 °C durante 24 horas (la relación de péptido:NBD fue 1:20). El péptido conjugado fue purificado en una columna G-10 para exclusión por tamaños. La concentración del péptido marcado fue determinada por absorbancia ( $\epsilon_{480} = 25.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{336} = 9.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El péptido marcado fue incubado con liposomas en un pH neutro y se desencadenó la inserción mediante la reducción del pH a 4,0. Los espectros de fluorescencia del péptido marcado con NBD en disolución e insertado en la bicapa lipídica fueron registrados en un espectrofluorómetro SLM8000. Se controlaron los cambios en la señal de fluorescencia del NBD a 530 nm (excitación a 470 nm) después de la adición del ditionito y después de la ruptura de los liposomas mediante Triton. En otros experimentos, se añadieron liposomas que contenían ditionito al péptido marcado en disolución en un pH de 8,0, se redujo luego el pH a 4,0, se añadió Triton para romper los liposomas y se añadió más ditionito para la sofocación completa de la fluorescencia del NBD.

### Líneas celulares

En el estudio se utilizaron líneas celulares tanto de cáncer humano como de cáncer de ratón. Las células HeLa fueron proporcionadas por el Cancer Center de la Yale University Medical School. Las células de cáncer de próstata TRAMP-C1 (CRL-2730) y las de adenocarcinoma de mama (CRL-2116) procedían del American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; del inglés, Dulbecco's modified Eagle medium) complementado con suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum) al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%, a 37 °C.

### Ensayo de citotoxicidad

Se examinó la citotoxicidad utilizando un ensayo colorimétrico estándar de acuerdo con un protocolo establecido que proporciona Promega, Inc. Se cargaron células HeLa en los pocillos de placas de 96 pocillos (20.000 células por pocillo) y se incubaron durante 24 horas en DMEM complementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%, a 37 °C. El medio de crecimiento fue luego sustituido por el mismo medio pero que contenía 1% de FBS y cantidades crecientes de pHLIP (0,5, 1, 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$ ). Después de 24 horas de incubación, se sustituyó la disolución por DMEM y se añadió un reactivo colorimétrico (Ensayo CellTiter 96 AQueous One Solution) durante 1 hora, lo que fue seguido de la medición de la absorbancia a 490 nm en el dispositivo lector de placas. Todas las muestras se prepararon por

triplicado.

### Ensayo de fugas en la membrana

Se cargaron células HeLa en placas de 96 pocillos (2.000 células por pocillo) y se incubaron durante 24 horas en DMEM complementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%, a 37 °C. El medio de crecimiento fue luego sustituido por tampón de PBS que contenía CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM, en un pH de 7,4 o 6,5, y cantidades crecientes del péptido (0,5, 2, 5 y 10 µM). Después de 1 hora, se añadieron faloidina-TRITC en concentración 2 µM y SITOX-Orange (Molecular Probes) en concentración 0,5 µM durante 10 minutos y luego se realizó un lavado con tampón de PBS, pH de 7,4. La fluorescencia de la rodamina fue medida a 580 nm con una excitación a 544 nm, mediante un dispositivo lector de placas. Posteriormente se rompió la membrana celular por adición de Triton-100 al 0,5% y una nueva porción de faloidina-TRITC en concentración 2 µM y SITOX-Orange en concentración 0,5 µM, lo que fue seguido de un lavado con PBS. La señal de fluorescencia fue detectada antes y después del lavado, respectivamente. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

### Microscopía de fluorescencia

Para los estudios por microscopía de fluorescencia, se cultivaron las células en placas de 35 mm con ventanas de fondo de vidrio de 10 mm revestidas con colágeno. Las células fueron lavadas con tampón de PBS que contenía CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM, con un pH de 5,5, 6,5, 7,0 ó 7,4, y fueron luego incubadas en PBS con el pH experimental en ausencia o presencia de las construcciones de pHILIP-S-S-dansilo, pHILIP-colorante (rojo Texas o rodamina), pHILIP-S-S-faloidina-TRITC, pHILIP-faloidina-TRITC y pHILIP-S-S-PNA-TAMRA en diversas concentraciones (0,1 - 7 µM). Se midió el pH del medio antes y después de la incubación. El tiempo de incubación fue variado de 15 a 60 minutos. Las células cancerosas pueden acidificar el medio (tampón de PBS) en unos pocos minutos si el volumen de incubación es pequeño, lo que crea el problema de mantener constante el pH en 7,4 en el tampón de incubación de PBS. Se prefirió utilizar una baja densidad de células en la cámara, un mayor volumen y una mayor concentración de fosfato (hasta 50 mM en lugar del PBS estándar a 10 mM) y se comprobó rutinariamente el pH antes y después de los experimentos. La incubación fue seguida de la sustitución del tampón de PBS por medio L-15 de Leibovitz exento de fenol (complementado con FBS al 5%, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM) en el pH experimental durante una hora y luego (si no se indica otra cosa) en un pH de 7,4. Para controlar las células multinucleadas, se utilizó el colorante DAPI (Sigma-Aldrich) para tinción nuclear. Se trataron células HeLa con pHILIP-S-S-faloidina-TRITC en PBS con un pH de 6,5 durante 1 hora, lo que fue seguido del cambio de la disolución por DMEM complementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%, a 37 °C. Después de 48 horas, se añadió DAPI en concentración 0,5 µM, lo que fue seguido de lavado. Se tomaron imágenes fluorescentes usando un microscopio invertido Olympus IX71 de epifluorescencia. Algunas imágenes de las células teñidas con la construcción no escindible de pHILIP-faloidina-TRITC fueron tomadas en un microscopio óptico Zeiss Axioplan 2 con un módulo Zeiss LSM 5 PASCAL para exploración por láser, con excitación de un láser de He/Ne a 543 nm. Las imágenes de las células teñidas con dansilo fueron tomadas en un microscopio confocal BioRad MRC-1024 de dos fotones, con excitación a 740 nm. Cada vez que se llevaron a cabo experimentos de microscopía de fluorescencia y se observó la translocación del cargamento por el pHILIP, se verificó que las células marcadas estaban vivas mediante el uso del marcador SYTOX-Green de células muertas (Molecular Probes).

### Citometría de flujo

Se llevaron a cabo mediciones analíticas por citometría de flujo usando un instrumento de separación celular activada por fluorescencia (FACS; del inglés, *fluorescence activated cell sorting*). Se analizaron diez mil células en cada muestra. Las células se suspendieron en PBS con un pH de 6,5 ó 7,4 en presencia y ausencia de pHILIP-S-S-faloidina-TRITC (6 µM) a 4 °C o 37 °C durante 1 hora. Luego se lavaron dos veces con tampón de PBS con pH de 7,4, se resuspendieron en PBS con pH de 7,4 y se analizaron en el instrumento de FACS.

### Obtención de imágenes de fluorescencia de cuerpo completo

Se cultivaron células de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) en medio L-15 de Leibovitz complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95% a 37 °C. Se originó el tumor humano MDA-MB-231 mediante la inyección de células tumorales (2x10<sup>7</sup> células/ijada/0,2 ml) en la ijada derecha de hembras adultas de ratón desnudo atímico. La inyección se llevó a cabo mientras el animal estaba bajo anestesia, usando una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (9 mg/kg). Se anestesiaron los ratones desnudos y se les inyectó intravenosamente el péptido marcado con el colorante Cy5.5 (1 mg/kg). Como testigo, a un ratón sólo se le inyectó el colorante Cy5.5. Las imágenes de los ratones en diversas posiciones se tomaron a los 10 minutos, 30 minutos y 1, 2, 4 y 24 horas después de la inyección mediante un sistema IVIS de Xenogen (Alameda, California, EE.UU.) para obtención de imágenes.

### Estudio de toxicidad

Se inyectó intravenosamente el L-péptido (L-aminoácidos) o el D-péptido (D-aminoácidos), en la concentración

máxima (4 mg/kg), a hembras y machos de ratón de 4 semanas de edad y un veterinario los observó durante 6 semanas. En ningún ratón se observaron cambios fisiológicos ni de comportamiento.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### 5 Translocación selectiva de faloidina a través de la membrana celular por pHLIP

Los microtúbulos y los filamentos de actina son polímeros de proteínas del citoesqueleto, críticos para el crecimiento y la división celulares, la motilidad, la señalización y el desarrollo y mantenimiento de la forma celular. La característica más importante del citoesqueleto es su capacidad para reorganizarse rápida y localmente en respuesta a estímulos. Esto se lleva a cabo mediante la dinámica de no equilibrio de la reacción de polimerización de monómeros de actina en filamentos de actina y de dímeros de tubulina  $\alpha\beta$  en microtúbulos. La remodelación de actina microfilamentosa se asocia con la proliferación, motilidad e invasión celulares (Egelman, 1997, Structure 5, 1135; Kodama et al., 2004, J. Cell Biol. 167, 203; Rao y Li, 2004, Curr. Cancer Drug Targets 4, 345) y es un punto determinante crítico de la metástasis cancerosa (Banyard y Zetter, 1998, Cancer Metastasis Rev. 17, 449). Por lo tanto, las moléculas que actúan sobre el citoesqueleto de actina de las células tumorales e inhiben así la división y el movimiento celulares tienen un alto valor terapéutico.

En los últimos años se ha identificado un número creciente de productos naturales que se dirigen al citoesqueleto de actina y alteran su organización. La mayoría de ellos se aislaron de organismos invertebrados marinos, principalmente esponjas. Todos estos fármacos derivados de esponjas marinas son macrólidos poco habituales y pueden ser clasificados en varias familias principales, cada una con sus propias y diferentes estructuras químicas, propiedades bioquímicas y efectos celulares. Entre estos compuestos están las latrunculinas (remedan la actividad de proteínas secuestradoras de monómeros, las timosinas  $\beta$ ), swinhólido A y misakinólido A (se unen a monómeros de actina y evitan la formación de filamentos de actina), micalólido B y aplironinas (ambos inhiben la polimerización de la actina) y jasplakinólidos (jaspamidias; estabilizan los filamentos de actina). La faloidina es un péptido bicíclico soluble en agua (Figura 4a) aislado del hongo mortal *Amanita phalloides*, uno de la clase de las falotoxinas. Ejerce sobre los filamentos de actina la misma acción que los jasplakinólidos: se une fuertemente a los filamentos de actina en concentración nanomolar (Weiland et al., 1977, Curr. Probl. Clin. Biochem. 7, 11; Weiland et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5613) y los estabiliza frente a la despolimerización, reduciendo hasta 30 veces la concentración crítica para la polimerización. Por contraste con el jasplakinólido, que entra fácilmente en las células de mamífero, la faloidina no ha sido desarrollada para uso terapéutico porque no puede penetrar en la membrana celular. El jasplakinólido y otros fármacos antiactina penetran a través de la membrana de todas las células, tanto normales como cancerosas, lo que reduce significativamente su efecto terapéutico.

Se presenta una nueva tecnología de translocación de faloidina, selectiva en cuanto al pH, a través de la membrana celular (Figuras 4, 5 y 7). Se espera que los efectos biológicos de la translocación de faloidina a células vivas sean una inhibición de la contractilidad y la división celulares junto con la formación de células multinucleadas, ya que los núcleos podrían dividirse pero las células tratadas no. En realidad, la translocación de faloidina a células conduce a la inhibición de la dinámica del citoesqueleto y a la consiguiente pérdida de la capacidad de células unidas para contraerse y redondearse en respuesta al tratamiento con una disolución de disociación de EDTA/tripsina (Figura 11a y Figura 12).

En la Figura 11a se ilustran imágenes, por contraste de fase, de células HeLa incubadas (durante 1 hora) con la construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (1  $\mu$ M) en unos pHs de 6,5 y 7,4, lo que va seguido de lavado con PBS, pH de 7,4, antes (izquierda) y 5 minutos después de la adición de la disolución de disociación (derecha). Las células tratadas con el péptido-faloidina en un pH bajo permanecieron inalteradas, lo que es consistente con la estabilización del citoesqueleto por la faloidina-rodamina suministrada por el pHLIP. La Figura 11b es de imágenes de fluorescencia de núcleos teñidos con DAPI 0,5  $\mu$ M y se presentan las correspondientes imágenes, por contraste de fase, de las células HeLa multinucleadas. Se observó multinucleación a las 48 horas después del tratamiento de las células con pHLIP-S-S-faloidina-TRITC en concentración 1  $\mu$ M en un pH de 6,5 durante 1 hora.

La Figura 12 es de imágenes, de fluorescencia y contraste de fase, de las mismas células HeLa tratadas con la construcción escindible de pHLIP-S-S-faloidina-TRITC en concentración 2  $\mu$ M en un pH de 6,5 durante 1 hora, tomadas antes (izquierda) y 5 minutos después de la adición de la disolución de disociación (derecha). Las células débilmente teñidas se volvieron redondas (flechas) y las células intensamente teñidas permanecieron inalteradas, lo que muestra la estabilización del citoesqueleto por la faloidina-rodamina suministrada por el pHLIP.

Sin embargo, las células no tratadas o las células tratadas con la construcción en un pH normal fueron capaces de redondearse y disociarse de la superficie. Además, se observó la formación de células multinucleadas después de 48 horas de tratamiento con pHLIP-S-S-faloidina-TRITC (Figura 11a). También se ha comunicado la aparición de células multinucleadas (Figura 11b) después del tratamiento de las células con jasplakinólido.

## EJEMPLO 2

**Translocación selectiva de PNA a través de la membrana celular por pHLIP**

Las moléculas sintéticas que se pueden unir con elevada especificidad secuencial a una escogida diana de una secuencia génica son de mayor interés en los contextos médico y biotecnológico. Resultan esperanzadoras para el desarrollo de agentes terapéuticos génicos y dispositivos diagnósticos para análisis genético, y como herramientas moleculares para la manipulación de ácidos nucleicos. El ácido nucleico peptídico (PNA) es un compuesto análogo al ácido nucleico en que la cadena principal de azúcar-fosfato del ácido nucleico natural ha sido sustituida por una cadena principal peptídica sintética normalmente formada a partir de unidades de N-(2-aminoetil)-glicocola, lo que da lugar a una copia aciral y sin carga (Nielsen et al., 1991, Science 254, 1497). Es químicamente estable y resistente a la escisión hidrolítica (enzimática), y, por lo tanto, no se espera que se degrade dentro de una célula viva. El PNA es capaz del reconocimiento secuencialmente específico de DNA y RNA que obedece el esquema de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, y los complejos híbridos presentan una extraordinaria estabilidad térmica y unos efectos de fuerza iónica únicos. También puede reconocer secuencias homopurínicas dúplex de DNA, a las que se une por invasión de cadenas formando una secuencia triple estable de PNA-DNA-PNA con una cadena de DNA en forma de bucle (Ray y Norden, 2000, FASEB J. 14, 1041). Desde su descubrimiento, el PNA ha atraído una gran atención en la interfase de la química y la biología a causa de sus interesantes propiedades químicas, físicas y biológicas y de su potencial para actuar como un componente activo para aplicaciones diagnósticas y también farmacéuticas. Estudios *in vitro* indican que el PNA podría inhibir tanto la transcripción como la traducción de genes hacia los cuales ha sido dirigido, lo que sigue siendo esperanzador para su uso en terapia antígenos y antisentido. El suministro de oligonucleótidos y oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos a células es un importante problema en el desarrollo completo de una tecnología antisentido para el control de la expresión génica en cultivo celular e *in vivo*. Incluso el suministro, que implica el paso a través de la membrana celular, de PNA, que es mucho menos polar que el DNA y el RNA, es un problema importante.

En las Figuras 13 y 14 se muestra una nueva tecnología de translocación de PNA, selectiva en cuanto al pH, a través de la membrana celular. En la Figura 13 se muestra el suministro de PNA a células HeLa por pHLIP. Se muestran imágenes de fluorescencia de células incubadas (durante 30 minutos) con una construcción escindible de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA (1  $\mu$ M) en pHs de 7,4 y 6,5. No se observó translocación de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA en un pH de 7,4 ni de PNA-TAMRA en pHs de 7,4 y 6,5 (datos no mostrados). Usando el marcador de células muertas, SYTOX, se confirmó la viabilidad de las células marcadas. Las imágenes de la Figura 14 ilustran el suministro de PNA a células HeLa por pHLIP. Se muestran imágenes de fluorescencia, con un aumento de 100x, de células incubadas con una construcción escindible de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA en pHs de 7,4 y 6,5. No se observó translocación de pHLIP-S-S-PNA-TAMRA en un pH de 7,4. Sin embargo, el pHLIP translocó PNA a través de la membrana celular en un pH de 6,5.

La eficacia de la translocación de PNA fluorescentemente marcado, mediante pHLIP, fue elevada en un pH bajo (6,5) y prácticamente cero en un pH normal.

Hay muchas enfermedades que crean un pH extracelular bajo, y, por lo tanto, se espera que el péptido sea funcional. La hipoxia y la acidosis son marcadores fisiológicos de muchos procesos morbosos tales como un cáncer (Stubbs et al., 2000, Mol. Med. Today 6, 15; Helmlinger et al., 2002, Clin. Cancer Res. 8, 1284; Izumi et al. 2003, Cancer Treat. Reviews. 29, 541); un infarto (Graham et al., 2004, J. Exp. Biol. 207, 3189; Yao y Haddad, 2004, Cell Calcium. 36, 247; Yamamoto y Ehara, 2005, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., en prensa); un accidente cerebrovascular (Rehncrona, 1985, Ann. Emerg. Med. 14, 770; Siesjo et al., 1996, Adv. Neurol. 71, 209; Ying et al., 1999, J. Neurochem. 73, 1549); una lesión aterosclerótica (Leake, 1997, Atherosclerosis 129, 149); un trauma (Mikhail, 1999, AACN Clin. Issues 10, 85; Clausen et al., 2005, J. Neurosurg. 103, 597); una inflamación (Kalantar-Zadeh et al., 2004, Semin. Dial. 17, 455); y una infección (Holloway et al., 1995; Exp. Parasitol. 80, 624; Headley, 2003, Am. Fam. Physician. 68, 323).

45

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

un polipéptido con una secuencia predominantemente hidrófoba lo suficientemente larga para abarcar una bicapa lipídica de membrana en forma de hélice transmembranal, y secuencias que flanquean dicha secuencia hidrófoba de modo que el péptido es soluble en disoluciones acuosas y se inserta espontáneamente a través de una membrana celular en un pH de 7,4 o menor, moviéndose una de las regiones de secuencia flanqueadora a través de la membrana celular y quedando otra región de secuencia flanqueadora expuesta al ambiente acuoso, fuera de la célula, en que dichas secuencias flanqueadoras comprenden una FS<sub>in</sub> en el extremo C de dicho polipéptido y una FS<sub>out</sub> en el extremo N de dicho polipéptido; y uno o más grupos funcionales unidos a dicho extremo C o dicho extremo N de dicho polipéptido,

caracterizada por que el polipéptido comprende la secuencia Sec.1:

AAEQNPYIYWARYADWLF TTP LLLLDLALLVDADEGTGG.

2. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 1, en que los aminoácidos de Sec 1 son L-aminoácidos, o uno o más de los aminoácidos especificados en Sec 1 son D-aminoácidos.

3. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional es seleccionado de entre reactivos terapéuticos, diagnósticos, profilácticos, para obtención de imágenes, para regulación génica, para regulación de funciones celulares, apoptóticos y para investigación.

4. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional es un ácido nucleico peptídico o un ácido nucleico.

5. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional es seleccionado de entre: un fármaco, un virus, un polisacárido, un liposoma, y una partícula compuesta de cualquier material.

6. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional es un antígeno, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un elemento citotóxico.

7. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional es escogido de entre faloidina, faloína, falisina, profaloína, falacina, falacidina y falisacina.

8. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional es una enzima marcadora tal como una peroxidasa, una luciferasa o una fosfatasa alcalina.

9. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional o cada uno de dichos grupos funcionales está fijado por un enlace escindible o no escindible que comprende una secuencia seleccionada de entre un disulfuro, un péptido con motivo ligante de proteínas, una secuencia de consenso de proteína cinasa, una secuencia de consenso de proteína fosfatasa, una secuencia reactiva con proteasas, una secuencia reactiva con peptidasas, una secuencia reactiva con transferasas, una secuencia reactiva con hidrolasas, una secuencia reactiva con isomerasas, una secuencia reactiva con ligasas, una secuencia reactiva con metaloproteasas extracelulares, una secuencia reactiva con proteasas lisosómicas, una secuencia reactiva con beta-lactamasas, una secuencia reactiva con oxidoreductasas, una secuencia reactiva con esterases, una secuencia reactiva con glicosidasas y una secuencia reactiva con nucleasas.

10. La composición de la Reivindicación 1 ó 2 para uso como un agente terapéutico, diagnóstico, profiláctico, para obtención de imágenes, para activación de una reacción inmune, para regulación génica o para regulación de funciones celulares, o como una herramienta para investigación.

11. La composición de la Reivindicación 1 ó 2 para uso como un agente para suministrar un grupo funcional, a través de membranas celulares, a células de un tejido enfermo con un ambiente extracelular ácido naturalmente producido o de un tejido con un ambiente extracelular ácido artificialmente provocado con respecto al pH fisiológico normal, en que el grupo funcional está unido al extremo C del polipéptido.

12. La composición de la Reivindicación 1 ó 2 para uso como un agente para suministrar un grupo funcional a superficies celulares de un tejido enfermo con un ambiente extracelular ácido naturalmente producido o de un tejido con un ambiente extracelular ácido artificialmente provocado con respecto al pH fisiológico normal, en que el grupo funcional está unido al extremo N del polipéptido.

13. Un método para suministrar *in vitro* un grupo funcional a través de una membrana celular en un pH extracelular ácido, caracterizado por el uso de una composición de acuerdo con la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional está unido al extremo C del polipéptido.

14. Un método para suministrar *in vitro* un grupo funcional a superficies celulares en un pH extracelular ácido, caracterizado por el uso de una composición de acuerdo con la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional está unido al extremo N del polipéptido.
- 5 15. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional está unido al extremo C del polipéptido, para uso como un agente para suministrar un grupo funcional, a través de membranas celulares, a células de un tejido enfermo con un pH extracelular bajo, que es el resultado de un cáncer, un infarto, una lesión aterosclerótica, un trauma, una inflamación, un accidente cerebrovascular o una infección microbiana o fúngica.
- 10 16. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que el grupo funcional está unido al extremo N del polipéptido, para uso como un agente para suministrar un grupo funcional a las superficies de células de un tejido enfermo con un pH extracelular bajo, que es el resultado de un cáncer, un infarto, una lesión aterosclerótica, un trauma, una inflamación, un accidente cerebrovascular o una infección microbiana o fúngica.
17. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicho polipéptido comprende además un resto de Cys en dicho extremo N.
- 15 18. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicho polipéptido comprende un colorante fluorescente covalentemente unido a un resto de Cys en dicho extremo N.
19. La composición de la Reivindicación 18, en que dicho colorante fluorescente comprende Cy5.5.

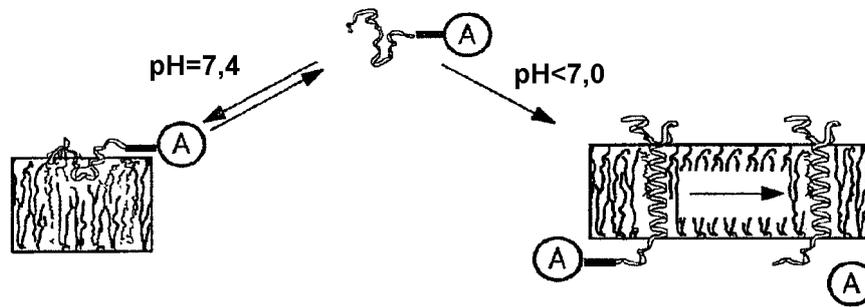


FIGURA 1a

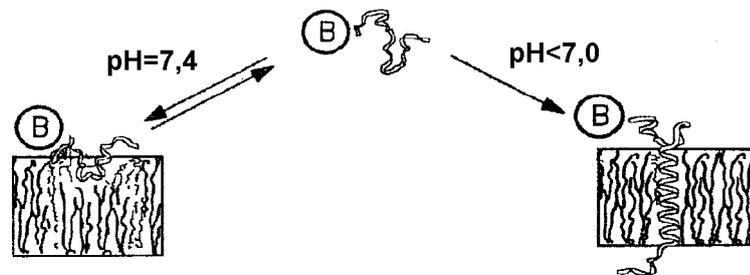


FIGURA 1b

- Ⓐ - molécula conjugada con la secuencia flanqueadora del pHLIP, que está situada dentro de la célula ( $FS_{in}$ )
- - enlace escindible
- Ⓑ - molécula conjugada con la secuencia flanqueadora del pHLIP, que se queda fuera ( $FS_{out}$ )

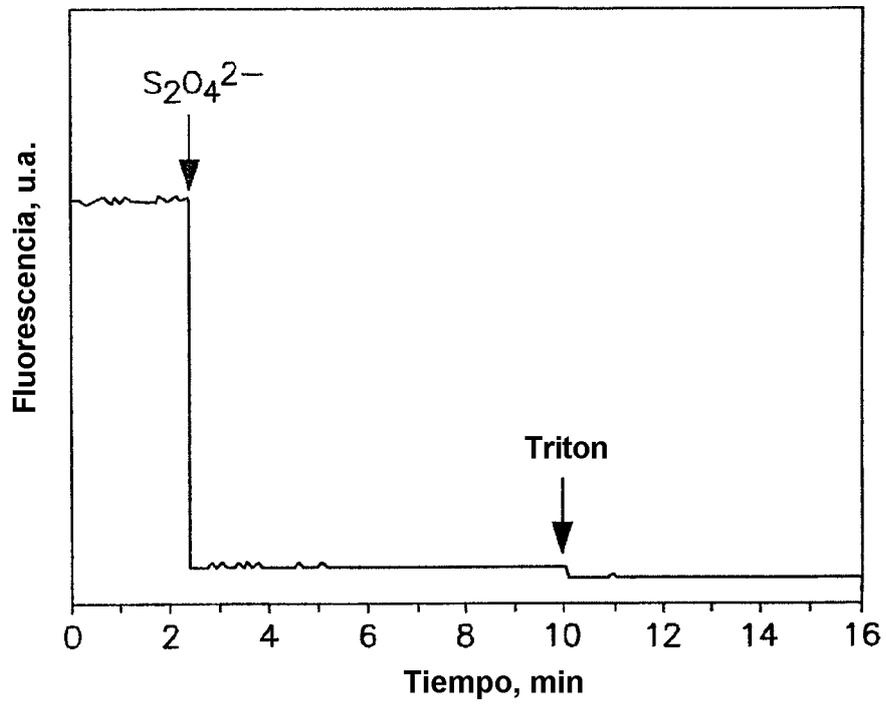


FIGURA 2a

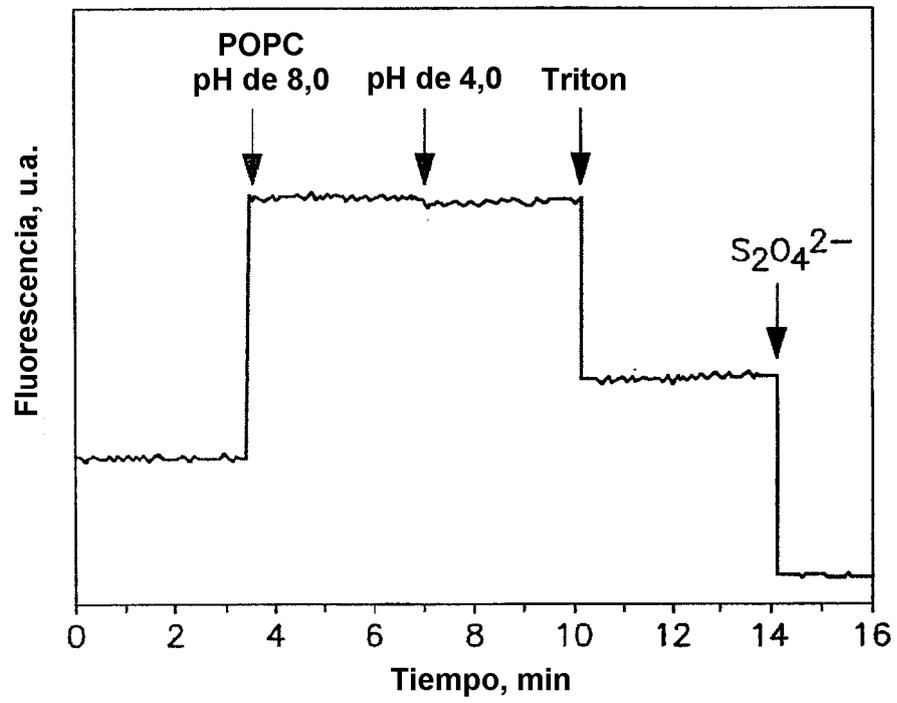
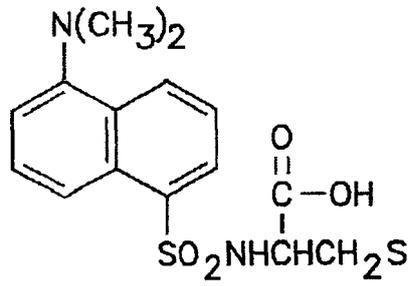
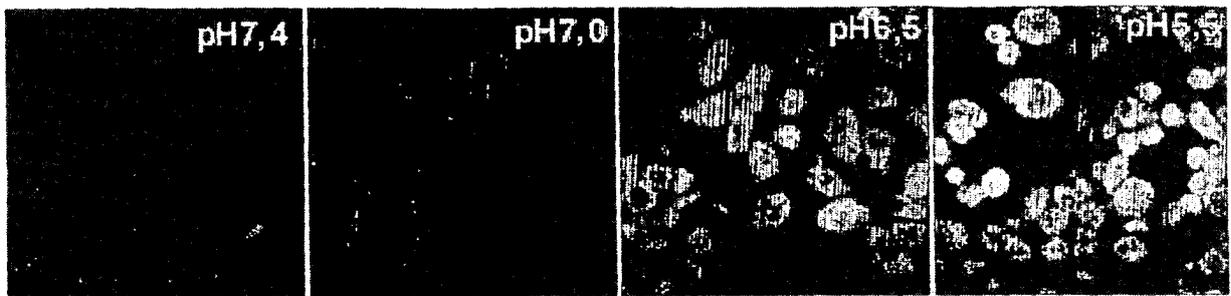


FIGURA 2b



**FIGURA 3a**



**FIGURA 3b**



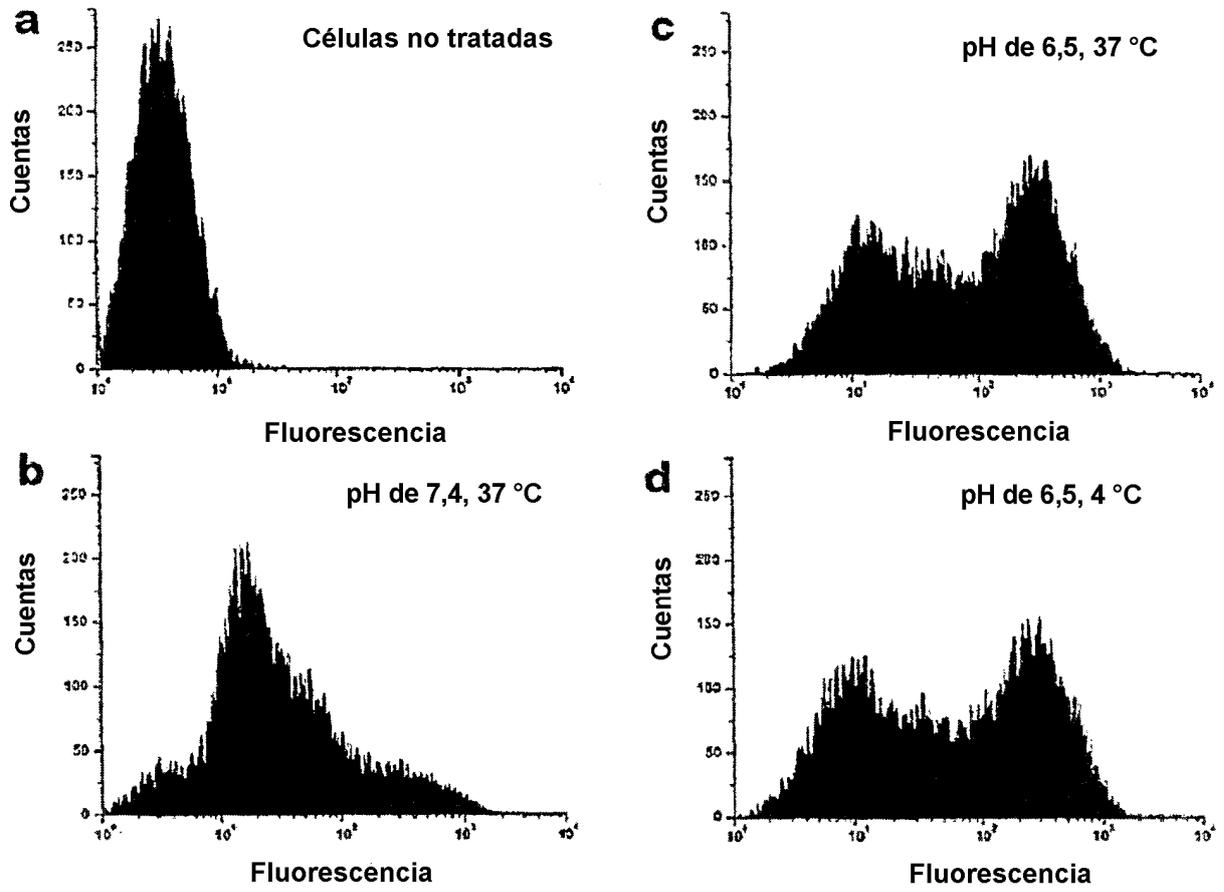
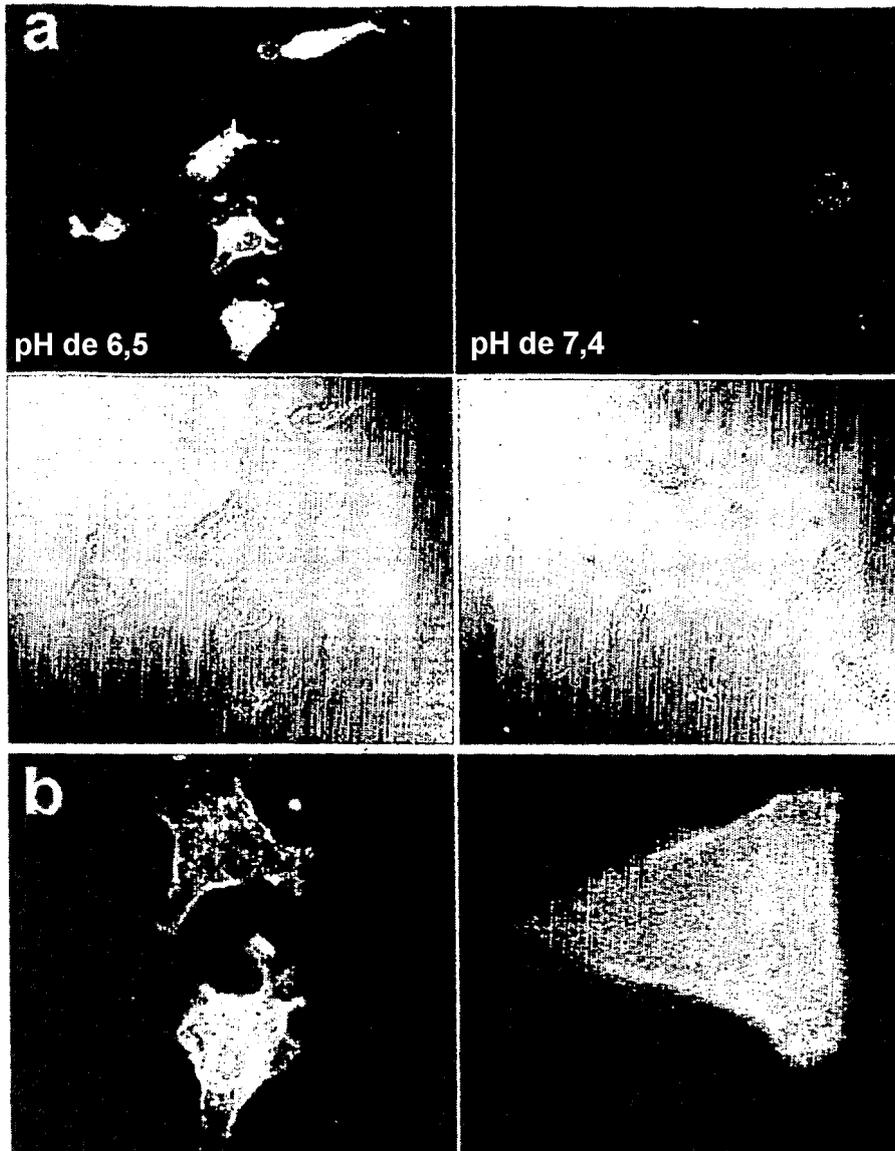
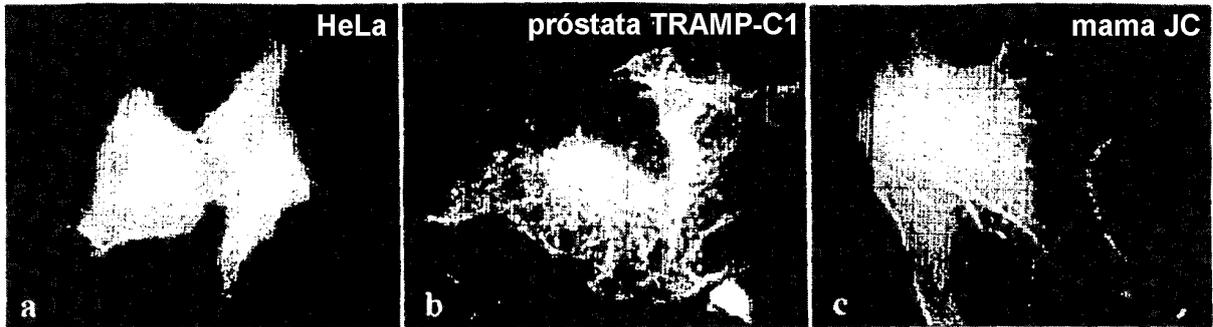


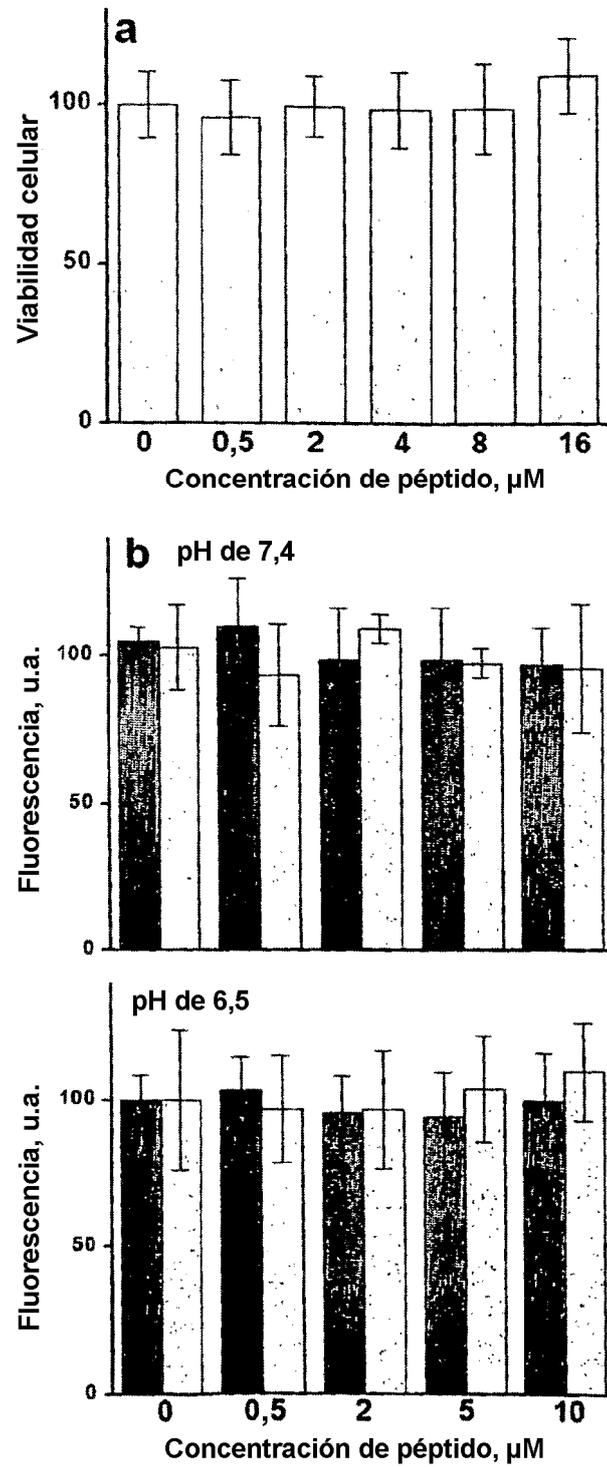
FIGURA 5



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

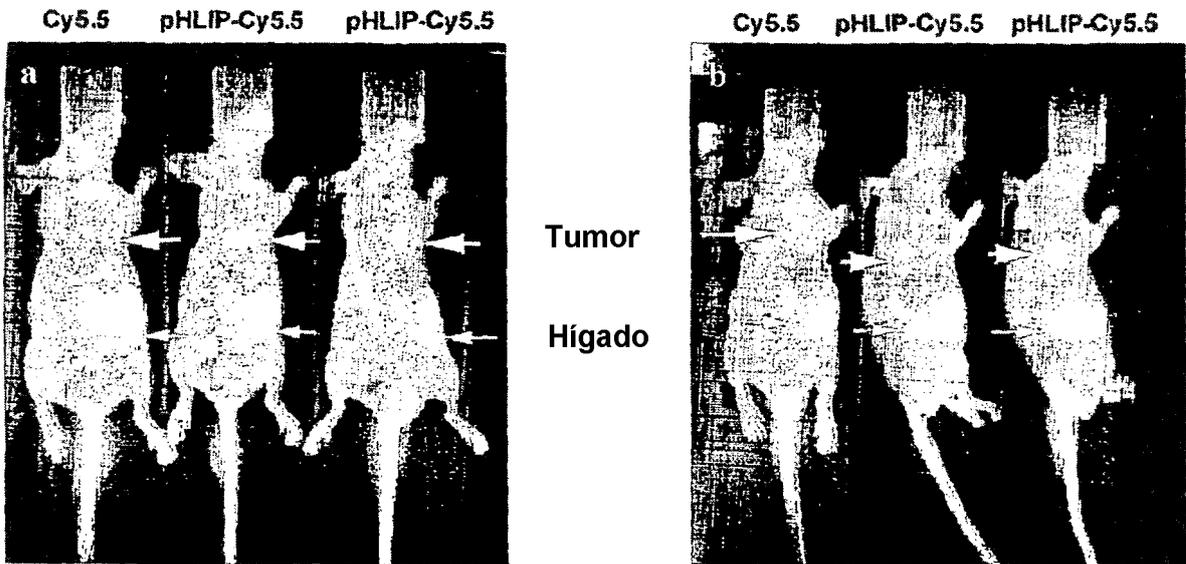
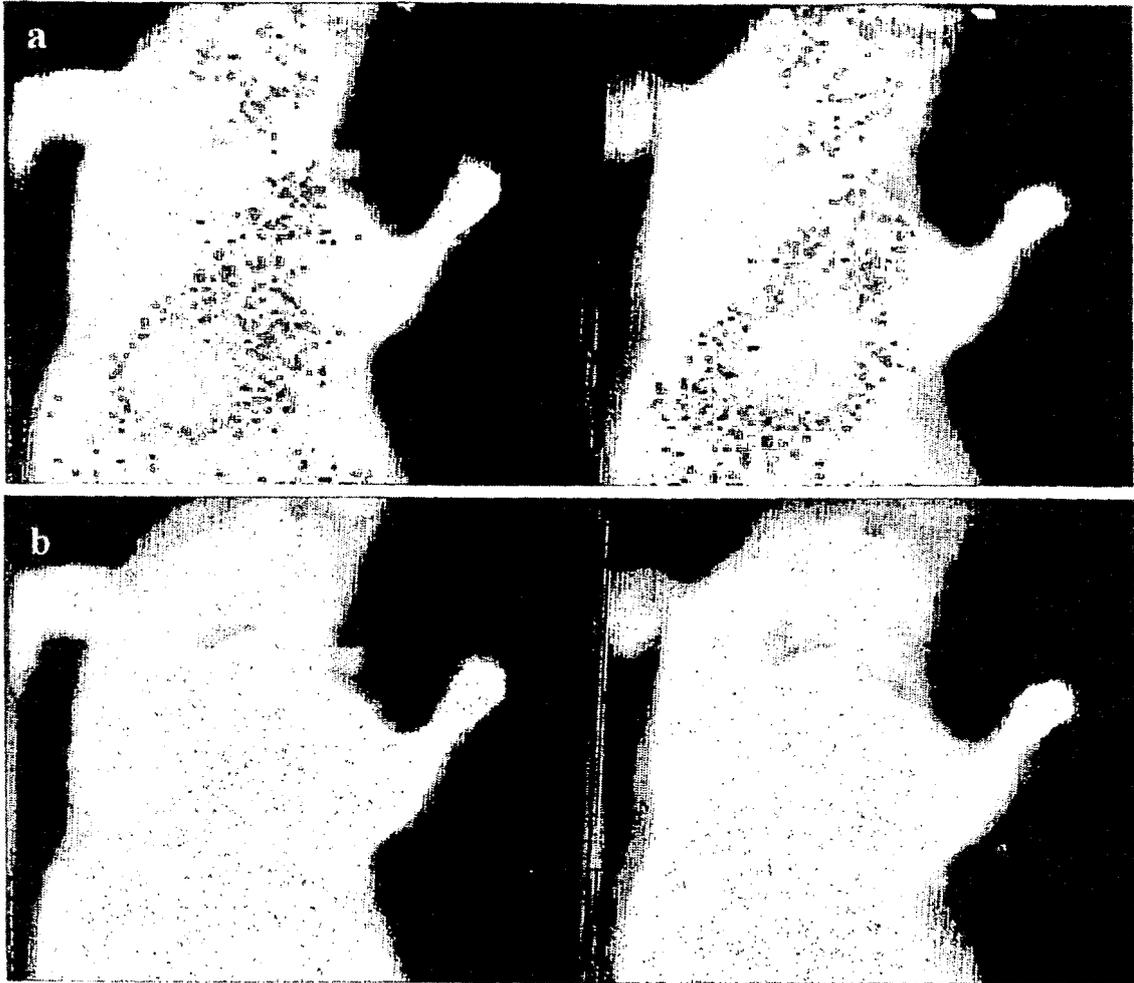


FIGURA 9



**FIGURA 10**

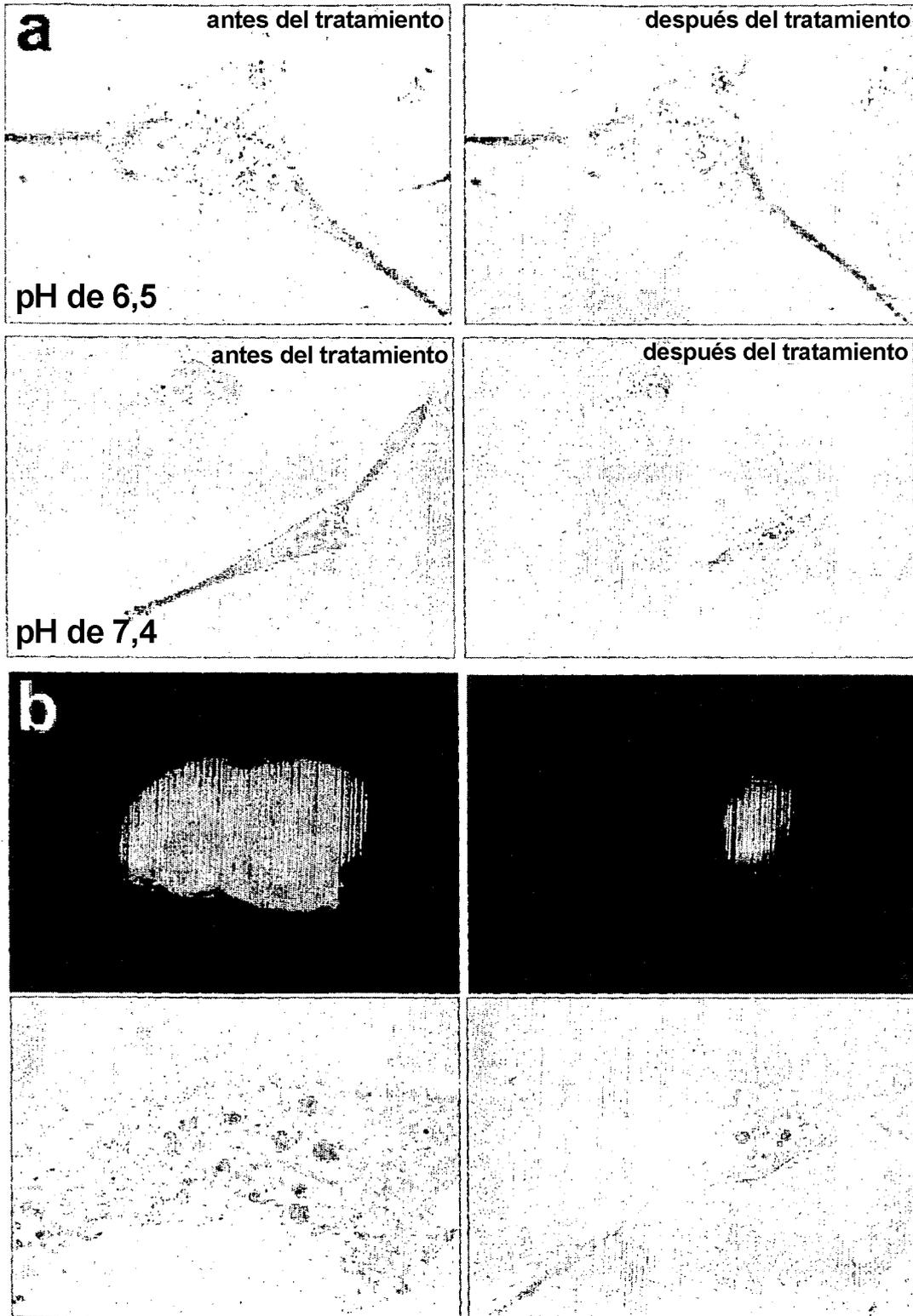
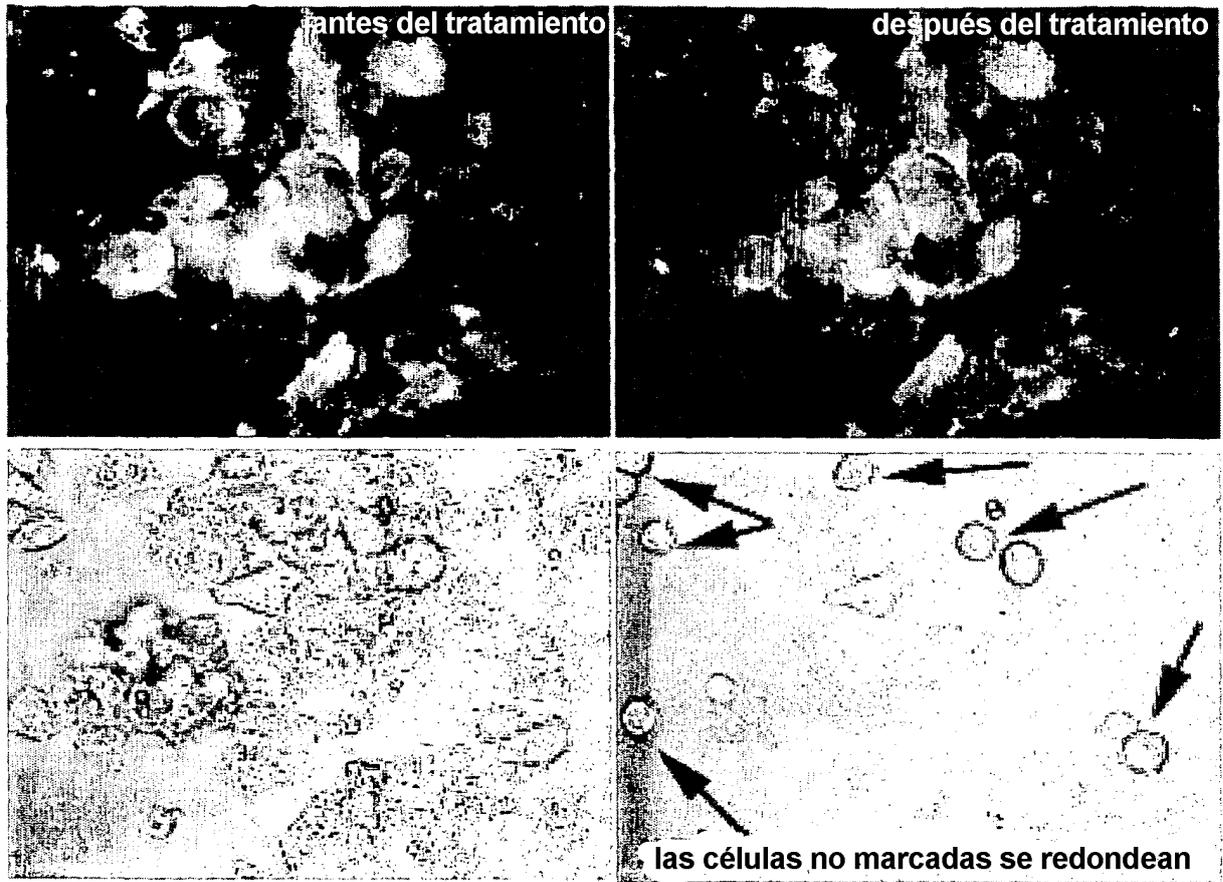
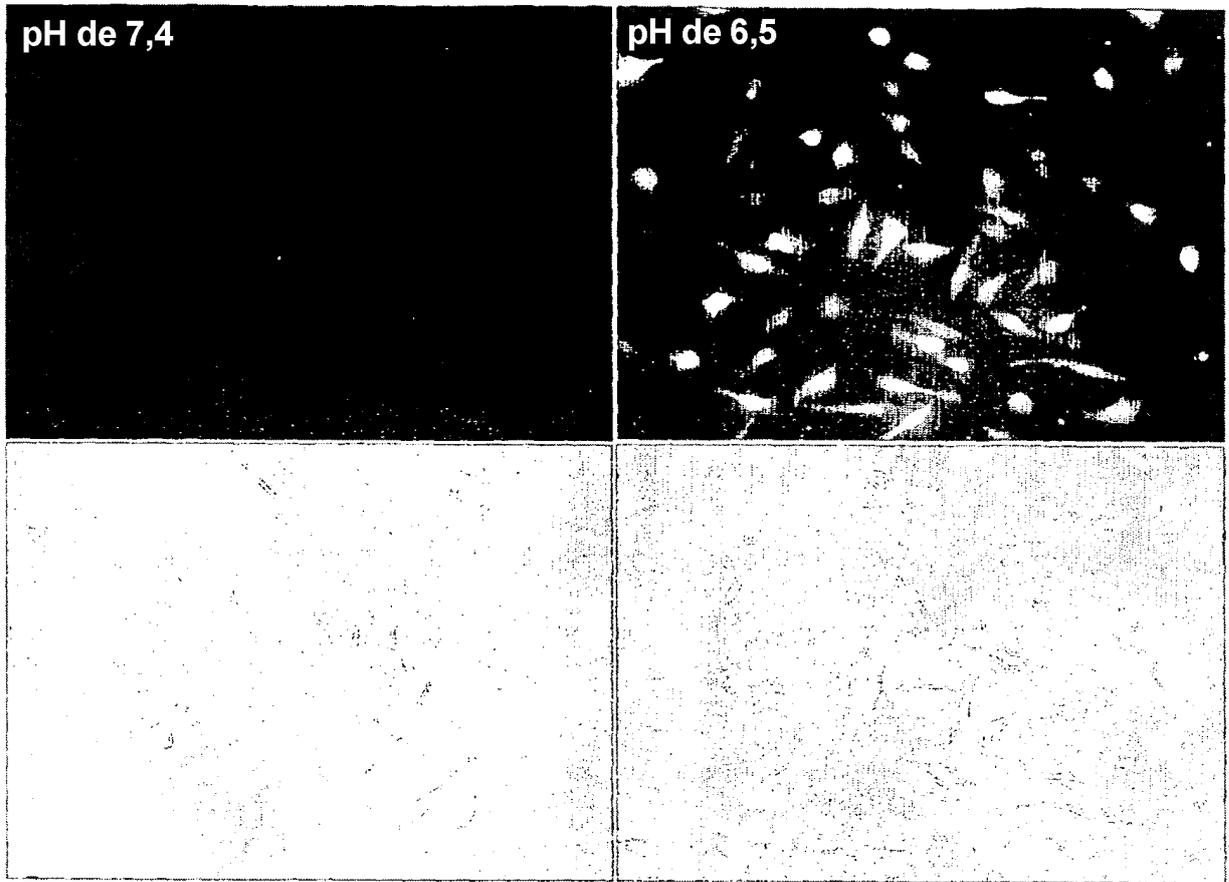


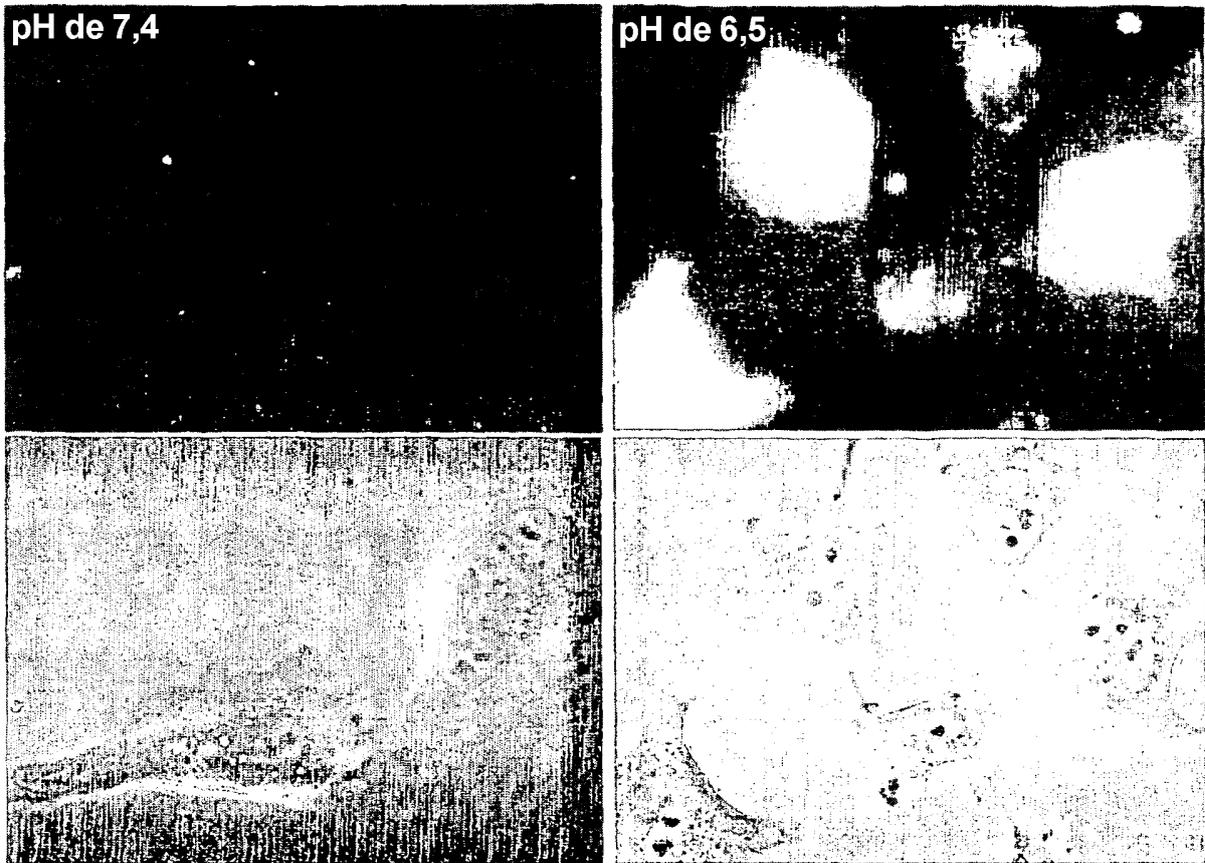
FIGURA 11



**FIGURA 12**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**