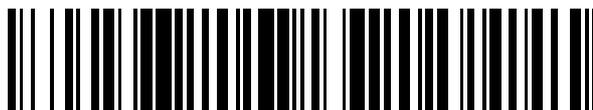


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 712**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2008 E 08779023 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2167136**

54 Título: **Moléculas para direccionar compuestos a varios órganos o tejidos seleccionados**

30 Prioridad:

12.07.2007 EP 07112323

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

18.07.2016

73 Titular/es:

BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. (50.0%)

J.H. Oortweg 21

2333 CH Leiden, NL y

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (50.0%)

72 Inventor/es:

HEEMSKERK, JOHANNES, ANTONIUS;

VAN DEUTEKOM, JUDITH, CHRISTINA,

THEODORA;

VAN KUIK-ROMEIJN, PETRA y

PLATENBURG, GERARDUS, JOHANNES

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 577 712 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

Moléculas para direccionar compuestos a varios órganos o tejidos seleccionados

5 Campo de la invención

[0001] La presente divulgación pertenece al campo del direccionamiento in vivo y proporciona moléculas que se dirigen a, se unen a y son absorbidas por varios órganos o tejidos.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Muchos compuestos terapéuticos son transportados hasta el órgano o tejido diana a través de la circulación. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el fármaco u otro tratamiento no solo dirigirá su acción al órgano o tejidos enfermos, sino que también será absorbido por otros órganos y tejidos del cuerpo.

15 Esto puede resultar en efectos secundarios no deseados debido a, por ejemplo, efectos tóxicos generalizados en todo el cuerpo del paciente.

De este modo, sería deseable dirigir la acción selectivamente sobre órganos o tejidos diana específicos.

Además, el acoplamiento de un compuesto terapéutico a una molécula dirigida puede mejorar las propiedades de absorción del compuesto en el tejido o células diana, dando como resultado una molécula más eficaz.

20 Por lo tanto, el acoplamiento a moléculas dirigidas produce compuestos que son más eficaces y menos tóxicos que el compuesto parental, ver Curnis et al., 2000, Nature Biotechnol. 18, 1185-1190.

Esto se puede aplicar a un vasto rango de compuestos, tales como péptidos, proteínas, agentes citostáticos, antibióticos y agentes antivíricos.

25 [0003] En el caso de enfermedades musculares tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la distrofia miotónica (DM) o la atrofia muscular espinal (AME), se pueden conjugar péptidos específicos para músculos, por ejemplo oligonucleótidos antisentido (OAS) y ARN interferente pequeño (ARNip).

Los OAS y ARNip tienen un alto potencial para ser aplicados como nuevas clases de medicinas para el tratamiento de enfermedades específicas mediante el bloqueo de la transcripción de genes no deseados.

30 En el campo de los tratamientos para la DMD, el salto de exón inducido en antisentido está ganando atención como una herramienta nueva y prometedora para la corrección del marco de lectura de traducción de la transcripción de distrofina.

El objetivo es manipular el empalme de manera que el exón diana se salte (a través de la unión de los OAS a pre-ARNm) y se genere una transcripción ligeramente más corta pero dentro del marco de lectura.

35 Esto permitiría la corrección del marco de lectura de traducción, y la inducción de la síntesis de una proteína de distrofina similar a la de la distrofia muscular de Becker (BMD) que puede mitigar significativamente la progresión de la enfermedad.

40 [0004] Diferentes informes han mostrado el potencial terapéutico de la estrategia del salto de exón para restaurar la producción de distrofina en las células musculares derivadas de pacientes cultivadas in vitro (van Deutekom et al., 2001, Hum. Mol. Genet. 10, 1547-1554) y en tejido muscular de ratón transgénico hDMD in vivo por inyecciones intramusculares (Bremmer-Bout et al., 2004, Mol. Ter. 10,232-240).

Sin embargo, el mayor obstáculo que hay que superar es la pobre absorción muscular in vivo de estos OAS, especialmente en todo tipo de miopatías como la distrofia miotónica (DM) y la atrofia muscular espinal (AME).

45 [0005] Un tratamiento eficaz para estas enfermedades de atrofia muscular requerirá que esencialmente todos los músculos esqueléticos incluyendo los de los brazos y piernas y los músculos implicados en la respiración así como el músculo cardíaco sean identificados como dianas.

Ninguno de los mecanismos investigados hasta la fecha tiene la capacidad para llevar específicamente oligonucleótidos (antisentido), menos aún genes enteros, a esencialmente todos los tejidos/células musculares simultáneamente por todo el cuerpo.

50 Los métodos para la administración in vivo de genes u otros compuestos en el músculo que han sido publicados hasta el momento incluyen la inyección de ADN desnudo con o sin electrotransferencia, el uso de microburbujas (Lu et al. 2003, Gene Ther. 10, 396-405) y la administración sistémica usando poloxámero (un hidroxipoli(oxi-etileno)poli(oxipropileno)).

Recientemente se demostró en ratones mdx que la administración sistémica de OAS morfolino resultó en un aumento de la expresión de distrofina en diferentes músculos (Alter et al., 2006, Nature Med. 12, 1-3).

Sin embargo, incluso después de una administración repetida, la expresión de distrofina fue apenas detectable en el diafragma y no fue detectable en el músculo cardíaco.

60 Además, en estos ratones mdx los OAS se absorben bastante fácilmente en los músculos debido a que las membranas musculares están afectadas, el cual no es el caso de los músculos de, por ejemplo, los pacientes de Duchenne jóvenes.

Asimismo, en otras enfermedades musculares como la AME y la DM, la administración de AON es complicada debido al hecho de que en este caso las paredes celulares musculares no están afectadas.

65 US6329501B divulga péptidos que son capaces de identificar como diana un tejido muscular sano.

No se sabe si estos péptidos podrían dirigirse a un tejido muscular enfermo.

[0006] Idealmente, un tratamiento para los músculos del cuerpo entero usaría la administración sistémica (por ejemplo por vía intravenosa o subcutánea) de un compuesto dotado con una capacidad de direccionamiento específico celular.

5 Se han descrito algunas moléculas que tienen potencial para la identificación como dianas de células musculares. El primer informe es de una secuencia peptídica con unión mejorada de músculo esquelético y cardíaco in vivo, que fue identificada mediante selección de una biblioteca de péptidos representados sobre fagos aleatoria (Samoylova and Smith, 1999, Muscle Nerve 22, 460-466).

10 Sin embargo, todavía no se ha demostrado si este péptido se puede usar o no para el direccionamiento in vivo de compuestos conjugados para células musculares.

También se han descrito varias secuencias de péptidos de 7 aminoácidos que fueron recuperadas de músculo esquelético humano después de una selección in vivo de una biblioteca de péptidos representados sobre fagos aleatoria (Arap et al., 2002, Nature Medicine 8, 121-127).

No se proporciona ninguna información sobre la unión a células de músculo cardíaco.

15 Asimismo, todavía no se ha demostrado si estos péptidos se pueden usar o no para el direccionamiento in vivo de compuestos conjugados para células musculares.

Otra molécula que se ha descrito es un fragmento Fv de un anticuerpo monoclonal (mAb) que es selectivamente transportado hasta el músculo esquelético in vivo (Weisbart et al., 2003, Mol. Immunol. 39, 783-789).

20 Se inyectaron fragmentos Fv monocatenarios del mAb murino en las venas de la cola de ratones y 4 horas más tarde los fragmentos fueron descubiertos en el 20% de las células de los músculos esqueléticos, principalmente localizados en el núcleo.

Se mostró que el mAb se enlaza a la proteína miosina tipo IIb en lisados de células de músculo esquelético, pero no enlazó ninguna proteína en lisados de células de músculo cardíaco.

25 Por lo tanto, este anticuerpo puede ser útil para la identificación como dianas de músculos esqueléticos, pero no del músculo cardíaco.

[0007] En el caso de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, un problema en el tratamiento de sustitución enzimática es la absorción pobre in vivo de la enzima recombinante terapéutica en las células musculares.

30 Por ejemplo, en la enfermedad de Pompe (enfermedad de almacenamiento lisosomal de tipo II) las dosis de α -glucosidasa ácida recombinante humana (rhGAA) que fueron necesitadas en estudios clínicos fueron muy elevadas, debido a la absorción pobre de la rhGAA en el músculo esquelético Winkel et al., 2004, Ann. Neurol. 55, 495-502).

[0008] A consecuencia de lo anterior, está muy claro que son necesarias otras mejoras en los sistemas de administración para conseguir la absorción específica de agentes tales como OAS in vivo.

35 Resumen de la invención

[0009] Es un objeto de la presente divulgación proporcionar compuestos, preferiblemente péptidos o péptidos miméticos, que se dirigen a un órgano o tejido o tipo celular de interés, especialmente células musculares incluyendo las del corazón.

40 Mediante el acoplamiento de fracciones de diagnóstico o de fracciones con una actividad biológica para tales compuestos dirigidos, dichas fracciones se dirigen a los órganos o tejidos o células específicos.

[0010] Después de una investigación extensa, los presentes inventores han identificado un número de péptidos que se unen y son absorbidos selectivamente por las células musculares, incluyendo las del corazón.

45 Esta invención satisface así la necesidad de mejorar la absorción in vivo de, por ejemplo, una enzima recombinante u oligonucleótidos (antisentido) terapéuticos, mediante la conjugación de tal enzima o oligonucleótidos a péptidos específicos para el músculo.

50 Las moléculas son ventajosamente útiles en los métodos de tratamiento antisentido para el tratamiento de miopatías, de terapia génica para enfermedades en las que los músculos sirven potencialmente como depósitos de producción de proteína y en la administración y transporte de una amplia variedad de diagnósticos o fármacos al corazón y células musculares.

[0011] De este modo, la presente invención se refiere a un péptido o péptido mimético que comprende o consistente en la secuencia

LGAQSNF (SEC ID n.º: 100).

[0012] La presente divulgación se refiere a un péptido o péptido mimético que comprende una secuencia o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo consistente en

60 QLFTSAS (SEC ID N.º: 3)

LYQDYSL (SEC ID N.º: 85)

65	SPNSIGT	STFTHPR	STIHGST	SAPRPLY
	AAQTSTP	YQDSAKT	VTAATLS	TYP AALL
	ELSPSAP	TVPQLTT	QNAPPSL	QTLLPSH
	TSFQPHR	GNTPSRA	LTQMSIS	RTLTPMP
				GTAPPVH

	HSPSKIP	FPHYPMS	ASHLEPS	AMTTKID	ATLTHPP
	HMATFHY	LLATPTP	AQPNKFK	MPALLRS	LPPEHPL
	AHPQLAT	YAGPYQH	HWEMWSY	QAPRLWS	HTPNSTH
5	SNQLVEG	FSPSTPN	ASSPVHR	SPHSASL	DQLPLIP
	SLAAYLH	WSQMHFL	SIPLLNH	NQQFYIL	FESRLTA
	QPLSNAS	KPAYGST	ANYSVSI	YSHTAAT	QHPPWRV
	MPAVPHS	SALLPSF	THPPTTH	SNSIRPN	ASVQQRG
	FPPSFTA	MQQGPRP	QKTALPL	TYGTKIS	SLKLLNQ
10	TSSTMNR	YKHTPTT	GSWYQVP	YYFPPFY	AYKPVGR
	ASTLKWA	TWTFRIP	SYMIQLS	IQSPHFF	SVSPWGI
	THLPWQT	AHSMGTG	FMSPLWT	IVNTAPL	STFTKSP
	IPTLPSS	AFVSRQP	SSLPLRK	TYSTLGY	VTYKTAS
	EPLQLKM	WSLQASH	TLWVPSR	QGMHRGT	
	SESMSIK	LPWKPLG	QSPHTAP	TPAHPNY	SLLGSTP
15	TALPPSY	VNSATHS	LPLTPLP	NQLPLHA	TQTPLKQ
	HAIYPRH	AMISAIH	NLTRLHT	HVIANAG	

[0013] El grupo anteriormente mencionado tiene los identificadores de secuencia SEC ID n.º: 1 - SEC ID n.º: 100.

20 [0014] Además, la presente invención concierne conjugados de un péptido o péptidos miméticos que comprenden o consisten en la secuencia LGAQSNF (SEC ID n.º: 100) y una fracción seleccionada de una fracción biológicamente activa y fracción de diagnóstico enlazada a ella.

25 [0015] Asimismo, la presente divulgación concierne conjugados de un péptido o péptidos miméticos que comprenden una secuencia o que consisten en una secuencia seleccionada del grupo consistente en QLFTSAS (SEC ID n.º: 3)
LYQDYSL (SEC ID n.º: 85)

	SPNSIGT	STFTHPR		STIHGST	SAPRPLY
30	AAQTSTP	YQDSAKT	AVTINEP	VTAATLS	TYPALL
	ELSPSAP	TVPQLTT	QNAPPSL	YDIDNRR	QTLLPSH
	TSFQPHR	GNTPSRA	LTQMSIS	RLTLPMP	GTAPPVH
	HSPSKIP	FPHYPMS	ASHLEPS	AMTTKID	ATLTHPP
35	HMATFHY	LLATPTP	AQPNKFK	MPALLRS	LPPEHPL
	AHPQLAT	YAGPYQH	HWEMWSY	QAPRLWS	HTPNSTH
	SNQLVEG	FSPSTPN	ASSPVHR	SPHSASL	DQLPLIP
	SLAAYLH	WSQMHFL	SIPLLNH	NQQFYIL	FESRLTA
	QPLSNAS	KPAYGST	ANYSVSI	YSHTAAT	QHPPWRV
	MPAVPHS	SALLPSF	THPPTTH	SNSIRPN	ASVQQRG
40	FPPSFTA	MQQGPRP	QKTALPL	TYGTKIS	SLKLLNQ
	TSSTMNR	YKHTPTT	GSWYQVP	YYFPPFY	AYKPVGR
	ASTLKWA	TWTFRIP	SYMIQLS	IQSPHFF	SVSPWGI
	THLPWQT	AHSMGTG	FMSPLWT	IVNTAPL	STFTKSP
	IPTLPSS	AFVSRQP	SSLPLRK	TYSTLGY	VTYKTAS
45	EPLQLKM	WSLQASH	TLWVPSR	QGMHRGT	
	SESMSIK	LPWKPLG	QSPHTAP	TPAHPNY	SLLGSTP
	TALPPSY	VNSATHS	LPLTPLP	NQLPLHA	TQTPLKQ
	HAIYPRH	AMISAIH	NLTRLHT	HVIANAG	

50 y una fracción seleccionada de una fracción biológicamente activa y una fracción de diagnóstico enlazada a ella.

[0016] Un conjugado tal y como se ha descrito anteriormente para ser usado como un medicamento es un aspecto de esta divulgación.

55 Descripción detallada de la invención

[0017] La presente divulgación proporciona péptidos o péptidos miméticos para direccionar fracciones de diagnóstico o fracciones biológicamente activas hasta un órgano o tejido o tipo celular de interés, especialmente células musculares incluyendo las del corazón.

60 [0018] Un péptido en el contexto de esta invención comprende al menos 7 aminoácidos.

El péptido puede estar completamente construido de L-aminoácidos de origen natural, o puede contener una o varias modificaciones a la(s) cadena(s) principal y/o lateral.

65 Estas modificaciones se pueden introducir por incorporación de miméticos de aminoácido que muestran una similitud al aminoácido natural.

El grupo de péptidos anteriormente descrito que comprende uno o varios miméticos de aminoácido se denomina

péptidos miméticos.

En el contexto de esta invención, los miméticos de aminoácidos incluyen, pero de forma no limitativa, β 2- y β 3-amino ácidos, aminoácidos β 2,2- β 2,3, y β 3,3-disustituidos, aminoácidos α , α -disustituidos, derivados de estatina de aminoácidos, D-amino ácidos, α -hidroxiácidos, ácidos α -aminonitrilos, N-alquilamino ácidos y similares.

5 Además, el extremo C del péptido puede ser ácido carboxílico o carboxamida, u otro resultante de la incorporación de uno de los miméticos de aminoácido anteriormente mencionados.

Además, los péptidos anteriormente descritos pueden contener uno o varios reemplazos de enlaces de péptido nativo con grupos que incluyen, pero no se limitan a, sulfonamida, retroamida, que contiene aminooxi, éster, alquil cetona, α , α -difluorocetona, α -fluorocetona, enlace de peptoide (enlace de amida N-alquilado glicil).

10 Además, los péptidos mencionados anteriormente pueden contener sustituciones en la cadena lateral de aminoácido (en referencia a la cadena lateral del aminoácido natural correspondiente), por ejemplo 4-fluorofenilalanina, 4-hidroxisilina, 3-aminoprolina, 2-nitrotirosina, N-alquilhistidina o aminoácidos β -ramificados o miméticos β -ramificados de aminoácido con quiralidad en el átomo de carbono de la cadena β -lateral en oposición a la quiralidad natural (por ejemplo alo-treonina, alo-isoleucina y derivados).

15 En otra forma de realización, el grupo de péptidos anteriormente mencionado puede contener análogos estructurales cercanos de aminoácidos o miméticos de aminoácidos, por ejemplo omitina en vez de lisina, homofenilalanina o fenilglicina en vez de fenilalanina, β -alanina en vez de glicina, ácido piroglutámico en vez de ácido glutámico, norleucina en vez de leucina o las versiones oxidadas por azufre de la metionina y/o cisteína.

20 Las formas lineales y cíclicas de los péptidos mencionados anteriormente están cubiertas por esta patente, al igual que sus análogos retro, inversos y/o retroinversos.

Puede que muchas más variaciones cercanas sean conocidas por los expertos en la técnica, pero el hecho de que no se mencionen aquí no limita el alcance de la presente invención.

25 En una forma de realización, un péptido o péptido mimético según la presente invención es de como máximo 30 aminoácidos de longitud, o al menos de 25 aminoácidos o 20 aminoácidos o 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 o 7 aminoácidos de longitud.

[0019] Una fracción biológicamente activa es un compuesto que desempeña (directa o indirectamente) una función biológica, preferiblemente una función terapéutica, por lo tanto es preferiblemente un compuesto terapéuticamente activo.

30 Un compuesto terapéuticamente activo puede ser cualquier compuesto conocido en la técnica y es preferiblemente un compuesto que tiene un efecto terapéutico por la modulación de un proceso intercelular.

Un compuesto terapéuticamente activo que tiene un efecto de modulación (directo) o función biológica (directa) puede ser por ejemplo cualquier proteína, inhibidor enzimático, oligonucleótido ARNip, gen, o farmacéutico.

35 Cualquier compuesto biológicamente activo o compuesto terapéuticamente activo se puede usar siempre que se pueda enlazar o pueda hacerse adecuado para ser enlazado a un péptido o péptido mimético según la presente invención.

El compuesto biológicamente activo o compuesto terapéuticamente activo, así, se convierte en la fracción del compuesto según la presente invención.

40 La persona experta será capaz de identificar compuestos biológicamente activos o terapéuticamente activos adecuados.

[0020] En una forma de realización, el compuesto biológicamente activo o compuesto terapéuticamente activo es un compuesto que comprende o consiste en ácidos nucleicos o sus análogos.

45 Se puede considerar que tales compuestos ejercen (indirectamente) una función biológica, preferiblemente una función terapéutica, al modular la maquinaria genética de una célula, en particular al nivel de la producción de proteínas.

50 El ácido nucleico puede ser un ADN, ARN o sus análogos, tales como compuestos que comprenden nucleótidos de 2'-O-alquilo o 2'-O-alqueno (alilo) o 2'-O-alquino, por ejemplo nucleótidos de 2'-O-metil-, 2'-O-metoxietil- (MOE) y 2'-O-alilo, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos peptidonucleicos (APN), ácidos nucleicos unidos por un puente de etileno (ENA), nucleótidos modificados con fosforotioato, por ejemplo nucleótidos de ARN de 2'-O-metoxietilo fosforotioato o nucleótidos de ARN de 2'-O-metilo fosforotioato, nucleótidos a base de morfolino y combinaciones de los mismos, etc. El ácido nucleico pueden ser un gen, un polinucleótido o un oligonucleótido, ARN interferente pequeño y similares.

55 [0021] En una forma de realización, una fracción de diagnóstico se enlaza a los péptidos o péptidos miméticos según la presente invención.

La fracción de diagnóstico puede ser para fines de diagnóstico in vivo o in vitro.

60 Los marcadores de imagenología, radiológicos o fluorescentes comúnmente usados tales como Cy3, Cy5, Cy5.5 y similares, o la proteína verde fluorescente (GFP) u otras proteínas de diagnóstico, posiblemente mediante expresión recombinante, se pueden utilizar como fracciones de diagnóstico.

[0022] Para preparar los conjugados según la presente invención, el acoplamiento de la fracción biológicamente activa o fracción de diagnóstico a los péptidos o péptidos miméticos según la presente invención ocurre a través de métodos conocidos para acoplar compuestos a aminoácidos o péptidos.

65 Un método común es la conexión de una fracción a un grupo amino libre o grupo hidroxilo libre o grupo de ácido carboxílico libre o grupo tiol libre en un péptido o péptido mimético.

Los métodos de conjugación comunes incluyen acoplamiento de tiol/maleimida, formación de enlaces éster o amida, o formación heterogénea de disulfuro.

La persona experta conoce la química estándar que puede utilizarse para provocar el acoplamiento requerido.

5 La fracción biológicamente activa o fracción de diagnóstico se puede acoplar directamente a un péptido o péptido mimético o se puede acoplar mediante una molécula espaciadora o enlazadora.

No es necesario que la fracción biológicamente activa o de diagnóstico esté enlazada de manera covalente al péptido o péptido mimético de la invención.

También se puede conjugar a través de interacciones electroestáticas.

10 En una forma de realización, la presente invención también se refiere a una molécula que comprende un péptido o péptido mimético según la invención y una parte de conexión, que no es un péptido, para conectar la molécula a una fracción biológicamente activa o una fracción de diagnóstico.

La parte de conexión, por ejemplo, puede ser un grupo (poli)catiónico que forma un complejo con un poli u oligonucleótido biológicamente activo.

15 Tal grupo (poli)catiónico puede ser una espermina o polietilenoimina, polietilenglicol, poli-L-lisina y similares.

[0023] Tal y como se menciona en una forma de realización, el péptido o péptido mimético según la presente invención se enlaza a una fracción biológicamente activa.

Por ejemplo, el péptido o péptido mimético se puede enlazar a un péptido biológicamente activo o terapéutico y en una forma de realización puede incluso formar parte de la estructura básica del péptido o del péptido mimético.

20 Por ejemplo, el extremo amino o carboxi de un péptido terapéutico se puede extender con una secuencia que comprende o consiste en los péptidos anteriormente descritos.

Debe entenderse que tal péptido extendido con un péptido o péptido mimético según la invención está incluido en un conjugado según la presente invención.

25 La preparación de tales péptidos se puede conseguir mediante procedimientos estándar de acoplamiento de aminoácidos o de péptidos.

[0024] En una forma de realización, el péptido o péptido mimético según la presente invención se combina con una señal de localización nuclear (NLS).

En una forma de realización, un conjugado según la presente invención se combina con una NLS.

30 En el contexto de la presente invención, la NLS funciona para dirigir los presentes conjugados, por ejemplo la fracción biológicamente activa o una fracción de diagnóstico, hasta un núcleo celular, supuestamente mediante su reconocimiento por los receptores de transporte nuclear citosólicos.

La NLS puede formar parte del péptido o péptido mimético según la presente invención, por ejemplo, el extremo amino o carboxi de una NLS se puede extender con una secuencia que comprende o consiste en los péptidos anteriormente descritos.

35 Además, una NLS se puede acoplar en una posición diferente de la del péptido o péptido mimético según la presente invención a una fracción biológicamente activa o una fracción de diagnóstico.

Las secuencias NLS se conocen en la técnica. Típicamente, una señal NLS consiste en o comprende (unas cuantas) secuencias cortas de lisinas y/o argininas cargadas positivamente, por ejemplo una NLS consiste en o comprende (K)KKR(K), (K)KRS(K), (K)(S)RK(R)(K). Algunas NLS conocidas son PKKKRKV, GKRSKV, KSRKRKL.

40 En una forma de realización, el péptido o péptido mimético según la presente invención se combina con una NLS seleccionada del grupo consistente en SEC ID n.º: 101-115.

[0025] En una forma de realización, un conjugado según la invención en el que la fracción biológicamente activa es una proteína o polipéptido y en el que el péptido o péptido mimético está comprendido en la proteína o esqueleto polipeptídico se prepara por expresión recombinante del péptido o péptido mimético junto con la proteína biológicamente activa.

45 Preferiblemente, se prepara un constructo de ADN de manera que el péptido o péptido mimético según la invención se exprese en un extremo del péptido biológicamente activo, preferiblemente en el extremo C del péptido biológicamente activo.

50 Tal preparación de constructos de ADN por metodología de ADN recombinante y expresión en un huésped adecuado es una práctica común para la persona experta.

De este modo, en una forma de realización, el presente conjugado es una proteína de fusión de un péptido según la presente invención, por ejemplo un péptido de SEC ID n.º: 1-100, con una proteína terapéuticamente activa, por ejemplo un anticuerpo, o una proteína (por ejemplo fluorescente) de diagnóstico o ambos, opcionalmente también que comprenden una NLS.

55 Tal proteína de fusión se puede preparar por expresión del constructo de ADN apropiado.

[0026] La presente invención, así, proporciona péptidos o péptidos miméticos para direccionar fracciones biológicamente activas tales como oligonucleótidos, genes, proteínas, fármacos y similares hacia varios órganos o tejidos normales, especialmente células musculares y el corazón.

60 Así la invención también concierne el uso de un conjugado según la invención para la preparación de un medicamento para el direccionar una fracción activa biológica o una fracción de diagnóstico a una célula muscular.

65 En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno asociado a las células musculares, incluyendo los trastornos cardíacos.

Los trastornos asociados a las células musculares incluyen miopatías, distrofia muscular y enfermedades de atrofia

muscular.

En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de trastornos asociados a la miostatina.

La miostatina también ha sido asociada a la diabetes mellitus de tipo II y a la obesidad.

5 De este modo, en una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo II y/o la obesidad.

En otra forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno asociado a las células musculares, incluyendo trastornos cardíacos seleccionados del grupo consistente en distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular congénita, distrofia muscular distal, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil, atrofia muscular espinal (juvenil, intermedia y adulta), atrofia muscular bulboespinal, dematomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome miasténico congénito, miopatía hipertiroidea, miopatía hipotiroidea, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, ataxia de Friedreich, enfermedad de Dejerine-Sottas, miotonía congénita (enfermedad de Thomsen y de Becker), paramiotonía congénita, enfermedad del núcleo central, miopatía nemalínica, miopatía miotubular (miopatía centronuclear), parálisis periódica (tanto hipocalémica como hipercalémica), miopatía mitocondrial y enfermedades musculares debidas a deficiencias en la carnitina y en las siguientes enzimas: fosforilasa, ácido maltasa (enfermedad de Pompe), fosfofructoquinasa, enzima desramificadora (también conocida como Amilo-1,6-glucosidasa); una enfermedad de almacenamiento de glucógeno también conocida como enfermedad de Forbes, carnitina palmitoiltransferasa, fosfoglicerato cinasa, fosfoglicerato mutasa, lactato deshidrogenasa y mioadenilato desaminasa.

[0027] En una forma de realización, los presentes conjugados también pueden usarse como una herramienta para la administración de genes no viral o para una terapia génica no viral.

25 A modo de conjugado, los presentes péptidos o petidomiméticos pueden direccionar constructos génicos hasta células, en particular células musculares.

En una forma de realización, el constructo génico permite la producción de una enzima en una terapia de sustitución enzimática o el constructo génico permite la producción de una proteína terapéutica tal como por ejemplo Factor VIII, Factor IX, factor VII, bilirrubina-JDP-glucuronosiltransferasa, todas las proteínas de trastorno de almacenamiento lisosomal tales como alfa-glucosidasa o en particular Aldurazyme®, Cerezyme®, Fabrazyme® o Myozyme®.

30 [0028] Una forma de realización de la invención es el direccionamiento de un virus o partícula viral hacia células. En un conjugado según la invención, el virus o partícula vírica es la fracción biológicamente activa.

En una forma de realización, el péptido o péptido mimético según la invención se enlaza a la fracción viral biológicamente activa mediante la inclusión la secuencia de ADN/ARN del péptido o péptido mimético en el genoma de un virus de manera que el péptido o péptido mimético se exprese en la superficie externa del virus o partícula viral.

La metodología recombinante para obtener tal expresión es bien conocida por la persona experta.

De este modo, el péptido o péptido mimético direcciona el virus o partícula viral hacia células/tejido específicos.

40 Esto es de interés particular para la vacunación direccionada, terapia génica, sustitución génica o constructos de salto de exón virales (vectores AAV que expresan secuencias antisentido de expresión fusionados o bien a ARN nuclear pequeño U1 o U7; Denti et al., 2006, Hum. Gene Ther. 17, 565-574).

45 [0029] En una forma de realización de la invención, el péptido o péptido mimético según la invención es seleccionado del grupo consistente en YQDSAKT, VTYKTAS, EPLQLKM' WSLQASH, TLWVPSR, QGMHRGT, LYQDYSL SESMSIK, LPWKPLG' QSPHTAP, TPAHPNY, SLLGSTP, TALPPSY, VNSATHS, LPLTPLP, NQLPLHA, GNTPSRA' TQTPLKQ, AMISAIH, NLTRLHT, HVIANAG, HAIYPRH y LGAQSNF.

50 [0030] En otra forma de realización de la divulgación, el péptido o péptido mimético según la invención es seleccionado del grupo consistente en SPNSIGT, STFTHPR, QLFTSAS, STIHGST, SAPRPLY, AAQTSTP, YQDSAKT, EPLQLKM, TLWVPSR, LYQDYSL, LPWKPLG, TPAHPNY, TALPPSY, LPLTPLP, HAIYPRH y GNTPSRA.

55 [0031] En otra forma de realización de la divulgación, el péptido o péptido mimético según la invención es seleccionado del grupo consistente en YQDSAKT, EPLQLKM, TLWVPSR, LYQDYSL, LPWKPLG, TPAHPNY, TALPPSY, LPLTPLP, HAIYPRH y GNTPSRA.

[0032] En una forma de realización de la divulgación, el péptido o péptido mimético según la invención es seleccionado del grupo consistente en YQDSAKT y GNTPSRA.

60 [0033] En una forma de realización de la divulgación, el péptido o péptido mimético según la invención es seleccionado del grupo consistente en QLFTSAS, LYQDYSL y LGAQSNF.

65 [0034] También se incluye en la presente invención el ADN consistente en o que comprende una secuencia que codifica un péptido según la presente invención y la secuencia de ADN complementaria de la misma y la transcripción de ARN de una secuencia de ADN consistente en o que comprende una secuencia que codifica de un péptido según la presente invención y la secuencia de ARN complementaria de la misma.

[0035] La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 **Ejemplos**

Ejemplo de referencia

10 Ejemplo 1: selección in vitro de péptidos contra mioblastos y miotubos

[0036] Una biblioteca de fagos de péptidos pre elaborada que contiene 2 billones de fagos que expresan péptidos de 7 aminoácidos aleatorios (New England Biolabs Inc.) ha sido seleccionada para identificar péptidos específicos para músculos.

15 Brevemente, la biblioteca de péptidos representados sobre fagos fue incubada con células colocadas en frascos de cultivo. Después de retirar los fagos no ligados, los fagos ligados específicamente o interiorizados fueron eluidos y amplificados. Después de una serie de diferentes pasos de bioselección in vitro, incluyendo tanto rondas de selección positiva como negativa en miotubos y fibroblastos de humano o de ratón respectivamente, el caldo fue enriquecido para la unión de secuencias que podían ser caracterizadas por secuenciación de ADN.

20 Por lo tanto, se identificaron péptidos específicos para músculos que enlazarán con y serán interiorizados por las células diana. Las secuencias peptídicas específicas que fueron descubiertas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: secuencias peptídicas encontradas después de la selección in vitro de miotubos de humano y de ratón

SPNSIGT ¹	STFTHPR ¹	QLFTSAS ¹	STIHGST ¹	SAPRPLY ¹
AAQTSTP ¹	YQDSAKT ¹	AVTINEP	VTAATLS	TYPALL
ELSPSAP	TVPQLTT	QNAPPSL	YDIDNRR	QTLLPSH
TSFQPHR	GNTPSRA	LTQMSIS	RLTLPMP	GTAPPVH
HSPSKIP	FPHYPMS	ASHLEPS	AMTKID	ATLTHPP
HMATFHY	LLATPTP	AQPNKFK	MPALLRS	LPPEHPL
AHPQLAT	YAGPYQH	HWEMWSY	QAPRLWS	HTPNSTH
SNQLVEG	FSPSTPN	ASSPVHR	SPHSASL	DQLPLIP
SLAAYLH	WSQMHFL	SIPLLNH	NQQFYIL	FESRLTA
QPLSNAS	KPAYGST	ANYSVSI	YSHTAAT	QHPPWRV
MPAVPHS	SALLPSF	THPPTTH	SNSIRPN	ASVQQRG
FPPSFTA	MQQGPRP	QKTALPL	TYGTKIS	SLKLLNQ
TSSTMNR	YKHTPTT	GSWYQVP	YYFPFFY	AYKPVGR
ASTLKWA	TWTFRIP	SYMIQLS	IQSPHFF	SVSPWGI
THLPWQT	AHSMGTG	FMSPLWT	IVNTAPL	STFTKSP
IPTLPSS	AFVSRQP	SSLPLRK	TYSTLGY	
¹ 1 secuencia encontrada más de una vez				

25 [0037] Dos de los péptidos que surgieron frecuentemente después de la selección en miotubos tanto de ratón como humanos, SPNSIGT y QLFTSAS, fueron sintetizados con un marcador fluorescente (FAM) y se evaluó su absorción en células musculares diferenciadas (miotubos) de humano y de ratón.

Los miotubos fueron obtenidos de cultivos de mioblastos humanos confluentes KM109 durante 7-14 días de privación de suero.

30 El cultivo fue posteriormente incubado con péptidos marcados con FAM y fotografiados con un microscopio de fluorescencia invertida, sin fijación previa.

Se observó una absorción significativa de estos péptidos en los miotubos cultivados.

[0038] El péptido QLFTSAS fue sintetizado con un marcador fluorescente (FAM) y posteriormente conjugado a un oligonucleótido antisentido (AON) de 2'-O-metil osforotioato de 21 aminoácidos.

35 Se obtuvieron miotubos de cultivos de mioblastos confluentes humanos KM109 durante 7-14 días de privación de suero.

El cultivo fue posteriormente incubado con el conjugado marcado con FAM y fotografiado con un microscopio de fluorescencia invertida, sin fijación previa.

40 Las fotografías mostraron que el conjugado se absorbe en las células musculares diferenciadas (miotubos) humanas cultivadas.

Ejemplo 2: selección de péptidos en ratones mdx

45 [0039] Para la realización de experimentos en ratones mdx, la biblioteca fue inyectada a través de la vena de la cola. Después de 10 a 20 minutos, los ratones fueron sacrificados y perfundidos, después de lo cual el corazón y diferentes grupos musculares fueron aislados. Los fagos ligados y/o interiorizados fueron recuperados de los tejidos homogeneizados, amplificados, y reaplicados a ratones mdx. Se seleccionaron y se caracterizaron más secuencias

enriquecidas. Las secuencias peptídicas específicas que fueron descubiertas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias peptídicas encontradas después de cuatro rondas de selección in vivo en ratones mdx, en músculo esquelético y el corazón

YQDSAKT ^{1,2}	VTYKTAS	EPLQLKM ¹	WSLQASH	TLWVPSR ¹
QGMHRGT	LYQDYSL ¹	SESMSIK	LPWKPLG ¹	QSPHTAP
TPAHPNY ¹	SLLGSTP	TALPPSY ¹	VNSATHS	LPLTPLP ¹
NQLPLHA	GNTPSRA ^{1,2}	TQTPLKQ	AMISAIH	NLTRLHT
HVIANAG	LGAQSNF	HAIYPRH ¹		
¹ Secuencia encontrada más de una vez				
² Secuencia también encontrada después de la selección in vitro (ver tabla 1)				

5 [0040] Tres de los péptidos que fueron descubiertos después de cuatro ciclos de selección in vivo fueron sintetizados con un marcador fluorescente (FAM) y se evaluó en cultivo celular su absorción en miotubos humanos como se describe en el ejemplo 1. Las fotografías muestran que los tres péptidos fueron absorbidos por miotubos humanos cultivados.

10 Ejemplo 3: coloración in vivo de fibras musculares después de inyección intramuscular

[0041] Los péptidos que mostraron absorción en mioblastos y miotubos humanos cultivados fueron sintetizados con un marcador fluorescente (FAM) e inyectados en el gastrocnemio (músculo de la pantorrilla) de ratones mdx de cuatro semanas.

Los péptidos QLFTSAS marcados con FAM (5 nmol inyectados), LiQDiSL (2,5 nmol inyectados) y LGAQSNF (2,5 nmol inyectados) fueron analizados.

Después de tres días, los ratones fueron sacrificados y los músculos fueron congelados instantáneamente.

15 Se cortaron secciones transversales, se fijaron con acetona y se prepararon para el análisis con un microscopio de fluorescencia.

20 Las secciones transversales fueron cortadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (cámara CCD).

[0042] Las fotografías mostraron que los péptidos QLFTSAS, LYQDYSL y LGAQSNF fueron absorbidos en un área grande de fibras musculares y todavía eran visibles después de 3 días.

25 Se veía claramente que las fibras enteras estaban manchadas homogéneamente, y que a veces se observaba una coloración de la membrana más intensa.

[0043] La absorción de los péptidos marcados con FAM QLFTSAS y LGAQSNF fue también evaluada en el músculo de un ratón saludable.

Se inyectaron 5 nmol de cada péptido en el músculo gastrocnemio.

Después de 3 días los ratones fueron sacrificados y se evaluó la cantidad de coloración.

Las muestras fueron fotografiadas con un microscopio de fluorescencia invertida.

30 Aunque las células musculares de estos ratones no tienen membranas afectadas como las células musculares de los ratones mdx, aun así se observó un área significativa de absorción de los péptidos QLFTSAS y LGAQSNF en las miofibras del músculo inyectado, como fue mostrado en las fotografías.

Ejemplo 4: salto de exón in vivo por conjugados de péptidos-AON

40 [0044] Los péptidos QLFTSAS y LGAQSNF fueron conjugados al oligonucleótido antisentido (AON) de 2'O-metilo fosforotioato de 20 aminoácidos. Se ha demostrado que este AON es capaz de inducir salto el salto del exón 23, tanto en cultivo celular como en el modelo de ratón mdx (Lu et al., 2003, Nature Med. 9, 1009-1014). Los conjugados fueron inyectados en el músculo gastrocnemio de ratones mdx. Los ratones recibieron dos inyecciones, con un intervalo de 24h, de 2,9 nmol de conjugado y fueron sacrificados después de 10 días. Posteriormente, se realizó un análisis RT-PCR de ARNm de distrofina en el músculo.

45 En la tabla 3 se muestran los porcentajes de salto en el músculo para AON M23 conjugado a los péptidos QLFTSAS y LGAQSNF. Ambos conjugados fueron capaces de inducir un salto del exón 23 en el músculo de los ratones mdx en el mismo rango que el oligonucleótido solo.

Tabla 3: salto de exón en ratones mdx por conjugados péptido-AON después de inyección intramuscular

Ratones mdx	
AON-(conjugado)	porcentaje de salto
AON desnudo	10 %
QLFTSAS-AON	7.5 %
LGAQSNF-AON	9.5 %

50 [0045] Se realizó el mismo experimento con ambos conjugados péptido-AON en ratones saludables. Los músculos de estos ratones no tienen membranas afectadas como los músculos de ratones mdx. Como se muestra en tabla 4, también en estos ratones saludables ambos conjugados fueron capaces de inducir un

salto del exón 23 en el músculo.

Tabla 4: salto de exón en ratones saludables por conjugados péptido- AON después de inyección intramuscular

Ratones sanos	
AON-(conjugado)	porcentaje de salto
AON desnudo	3 %
QLFTSAS-AON	3 %
LGAQSNF-AON	2 %

5 Ejemplo 5: absorción in vivo de conjugados péptido-AON

[0046] El AON M23 solo y el AON M23 conjugado a los péptidos QLFTSAS y LGAQSNF fue inyectado por vía intravenosa en ratones mdx. Los ratones recibieron 3 inyecciones, con un intervalo de 48 h, de 50 mg/kg de AON solo o del conjugado y fueron sacrificados después de 10 días. Posteriormente, el nivel de AON M23 en el músculo del cuádriceps y en el músculo cardíaco fue medido con una técnica ELISA de ligamiento-hibridación específica para AON M23.

En la tabla 5 la absorción de los conjugados AON M23-péptido en el cuádriceps y en el músculo cardíaco se muestra como un porcentaje de la absorción de AON M23 solo (la absorción de AON M23 solo se fija en 100 %). Se puede observar que la absorción de los conjugados en el músculo del cuádriceps es más de dos veces mayor y en el músculo cardíaco más de tres veces mayor que con el AON M23 solo.

Tabla 5: absorción de conjugados péptido-AON en el cuádriceps y músculo cardíaco después de administración sistémica, con respecto a la absorción de AON desnudo (fijada en 100 %)

	cuádriceps	corazón
AON desnudo	100 %	100 %
QLFTSAS-AON	201 %	333 %
LGAQSNF-AON	231 %	331 %

20 Ejemplo 6: objetivo de direccionamiento in vivo después de administración sistémica

[0047] El péptido LGAQSNF fue sintetizado con el marcador fluorescente Cy5.

Este marcador se puede detectar con una sensibilidad alta por un sistema de formación de imágenes por fluorescencia (NightOWL, Berthold Technologies) después de una inyección sistémica (intravenosa o subcutánea) en un ratón.

Esto permite controlar la distribución del compuesto a través de los diferentes órganos de un ratón vivo después de la inyección.

De este péptido, se inyectaron subcutáneamente 71 nmol en la espalda de un ratón mdx y después de 48 horas se tomó una imagen con el sistema de formación de imágenes.

La Figura 1 muestra la distribución del péptido LGAQSNF marcado con Cy5 48 horas después de la inyección subcutánea en un ratón mdx.

El ratón está tumbado sobre su espalda, y primero se afeitaron las patas posteriores y un área del abdomen debido a que los pelos de la piel perjudicaban la detección de la señal.

Se podía detectar una señal clara en la espalda, las patas anteriores y la cola.

La señal en la área afeitada del abdomen procede posiblemente del músculo abdominal.

Este resultado indica que el péptido, que fue inyectado en la espalda, es absorbido por el músculo abdominal y por músculos de las patas traseras, pies y cola del ratón.

40 Ejemplo 7: direccionamiento de proteínas a células musculares

[0048] Para examinar la capacidad de los péptidos LGAQSNF y QLFTSAS para transportar una proteína hasta células musculares, se prepararon constructos de ADN en los que la secuencia peptídica fue fusionada a la secuencia proteica.

Los siguientes constructos fueron preparados y expresados utilizando un vector de expresión bacteriano:

LGAQSNF – NLS - 3F5 - GFP

LGAQSNF - 3F5 - GFP

QLFTSAS - NLS - 3F5 - GFP

QLFTSAS - 3F5 - GFP

NLS: secuencia de localización nuclear KKRK

VHH 3F5: anticuerpo derivado de llama

GFP: proteína verde fluorescente

[0049] Mioblastos Immortomouse IM2 fueron incubados con proteína LGAQSNF-NLS-3F5-GFP purificada durante toda la noche.

El día siguiente, se llevó a cabo una obtención de imágenes por fluorescencia para valorar la absorción del constructo de proteína en las células.

Las imágenes mostraron que la proteína fue absorbida en el citoplasma de las células.
Esto indica que los péptidos dirigidos son capaces de transportar una proteína grande hasta células musculares.

REVINDICACIONES

- 5 1. Conjugado de un péptido o péptido mimético que comprende o consiste en la secuencia LGAQSNF (SEC ID n.º: 100) enlazada a una fracción seleccionada de una fracción biológicamente activa y una fracción de diagnóstico.
- 10 2. Conjugado según la reivindicación 1, donde la fracción biológicamente activa es seleccionada del grupo consistente en ADN, ARN o sus análogos, tales como compuestos que comprenden nucleótidos de 2'-O-alkilo, en particular 2'-O-mehoxietilo y 2'-O-metilo, o 2'-O-alkenilo (alilo) o nucleótidos de 2'-O-alkinilo, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos peptidonucleicos (APN), ácidos nucleicos unidos por un puente de etileno (ENA), nucleótidos modificados con fosforotioato, nucleótidos a base de morfolino y combinaciones de los mismos
- 15 3. Conjugado según la reivindicación 1 o 2 que es una proteína de fusión de un péptido de la SEC ID n.º: 100 con una proteína terapéuticamente activa y/o una proteína de diagnóstico.
- 20 4. Conjugado según la reivindicación 3 que comprende además una señal de localización nuclear.
5. Uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de un medicamento para el direccionamiento de una fracción activa biológica o de una fracción de diagnóstico a una célula muscular.
- 25 6. Uso según la reivindicación 5 donde el medicamento es para el tratamiento de un trastorno asociado a las células musculares, incluyendo trastornos cardíacos.
7. Uso según la reivindicación 5 donde el medicamento es para el tratamiento de una miopatía, distrofia muscular o enfermedad de atrofia muscular.
- 30 8. Uso según la reivindicación 5 donde el medicamento es para el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo II o la obesidad.
9. Molécula que comprende un péptido o péptido mimético que comprende o consiste en la secuencia LGAQSNF (SEC ID n.º: 100) y una parte de enlace que no es un péptido para enlazar la molécula a una fracción biológicamente activa o una fracción de diagnóstico.

