

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 917**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2004 PCT/US2004/034861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2005 WO05042034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2004 E 04817443 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 1691846**

54 Título: **Péptidos cuya captación por las células es controlable**

30 Prioridad:

31.10.2003 US 699562

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

17.11.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**JIANG, TAO y
TSIEN, ROGER Y.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 589 917 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**Péptidos cuya captación por las células es controlable****5 Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere a moléculas y composiciones farmacéuticas para el transporte de material a través de membranas celulares. También se describen métodos para preparar tales moléculas.

Introducción

15 Las membranas celulares delimitan los límites externos de las células, y regular el transporte hacia dentro y hacia fuera del interior de la célula. Constituidas principalmente de lípidos y proteínas, proporcionan una superficie hidrófila que encierra un interior hidrófobo a través de la cual deben pasar los materiales antes de introducirse en una célula. Aunque muchos compuestos lipófilos, pequeños son capaces de atravesar las membranas celulares de forma pasiva, la mayoría de los compuestos, partículas y materiales deben apoyarse en mecanismos activos con el fin de acceder a una célula viva.

20 Transporte transmembrana

La regulación del transporte hacia dentro y hacia fuera de una célula es vital para su viabilidad. Por ejemplo, las membranas celulares contienen canales de iones, bombas, e intercambiadores capaces de facilitar el paso transmembrana de muchas sustancias importantes. Sin embargo, el transporte transmembrana es selectivo: además de facilitar la entrada de sustancias deseadas en una célula, y facilitar la salida de los otros, un papel principal de una membrana celular es prevenir la entrada no controlada de sustancias al interior de la célula. Esta función de barrera de la membrana celular hace difícil el suministro de marcadores, fármacos, ácidos nucleicos y otros materiales exógenos a las células.

30 A lo largo de la última década, se han identificado secuencias de péptidos que pueden entrar fácilmente en una célula. Por ejemplo, la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) es capaz de entrar en las células desde el medio extracelular (p. ej., Fawell et al. P.N.A.S. 91:664-668 (1994)). Dicha captación es revisada, por ejemplo, por Richard et al., en J. Biol. Chem. 278(1):585-590 (2003).

35 Tales moléculas que son introducidas fácilmente en células también pueden ser utilizadas para transportar otras moléculas a las células junto a ellas. Las moléculas que son capaces de facilitar el transporte de sustancias a las células se han denominado "señales de translocación de membrana" (MTS) como describen Tung et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:281-294 (2003). Las MTS más importantes son ricas en aminoácidos tales como arginina con cadenas laterales cargadas positivamente. Las moléculas transportadas a la célula por tales péptidos catiónicos se pueden denominar "carga" y puede ser conectados reversible o irreversiblemente a los péptidos catiónicos. Un ejemplo de una conexión reversible se encuentra en Zhang et al., P.N.A.S. 95:9184-9189 (1994).

45 Las moléculas de MTS son comentadas, por ejemplo, por Wender et al., en P.N.A.S. 97:13003-13008 (2000); Hallbrink et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1515:101-109 (2001); Derossi et al, *Trends in Cell Biology*. 8:84-87 (1998); Rothbard et al., *J. Med. Chem.* 45:3612-3618 (2002); Rothbard et al., *Nature Medicine* 6(11):1253-1247 (2000); Wadia et al., *Curr. Opinion Biotech.* 13:52-56 (2002); Futaki et al.; *Bioconj. Chem.* 12:1005-1011 (2001); Rothbard et al., Patente de Estados Unidos con Núm. de Serie 6.306.993; Frankel et al., Patente de Estados Unidos con Núm. de Serie 6.316.003; Rothbard et al., Patente de Estados Unidos con Núm. de Serie 6.495.663; y Monahan et al., Patente de Estados Unidos con Núm. de Serie 6.630.351.

50 La captación facilitada por moléculas de MTS carece típicamente de especificidad, mejorando la captación en la mayoría o en todas las células. Por lo tanto, aunque las moléculas de MTS son capaces de entrar en las células, y pueden ser capaces de mejorar el transporte de otras moléculas unidas a las moléculas de MTS a las células, siguen siendo difíciles el control y la regulación de este tipo de transporte. Sin embargo, sería deseable tener la capacidad de dirigir el suministro de la carga a un tipo de célula, o a un tejido, o a una ubicación o región dentro del cuerpo de un animal. En consecuencia, sigue existiendo una necesidad en la técnica de dirigir, controlar y regular el suministro de moléculas de carga por medio de las moléculas de MTS.

60 Compendio de la invención

Se proporcionan moléculas y composiciones farmacéuticas para la administración controlada de sustancias a las células mediante moléculas de transporte. Las moléculas que tienen las características de la invención incluyen porciones de péptidos conectadas por una porción conectora escindible que puede ser un péptido. Los autores de la

presente invención han encontrado que la captación celular de moléculas de MTS con múltiples aminoácidos alcalinos puede inhibirse o prevenirse mediante la adición de una porción que tiene múltiples cargas negativas a pH fisiológico, tal como una porción de péptido que tiene múltiples aminoácidos ácidos. Por lo tanto, la invención proporciona una molécula que comprende A-X-B-C (Fórmula (I)), en donde C es un marcador o radical de carga terapéutica, B es un péptido de penetración celular con una secuencia que comprende de 5 a 20 aminoácidos alcalinos consecutivos; A es un péptido con una secuencia que comprende de 5 a 9 aminoácidos ácidos consecutivos seleccionados entre: aspartato y glutamato, que cuando se une a B es eficaz para inhibir o prevenir la captación celular de B - C; y X es un conector que consiste en 2 a 100 átomos que une A y B, configurado para su escisión en condiciones fisiológicas; en donde B está unido covalentemente a C, y en donde B es eficaz para mejorar el transporte de C a través de una membrana celular. La porción de péptido **A** está conectada mediante un conector escindible X a una porción de péptido **B**, de modo que mientras que la porción de péptido **A** está conectada a la porción de péptido **B**, se inhibe o se evita la captación de la molécula por las células. Una porción ácida **A** puede incluir algunos aminoácidos que son aminoácidos no ácidos, o también otros radicales; del mismo modo, una porción alcalina **B** puede incluir algunos aminoácidos que son aminoácidos alcalinos, o también otros radicales. La inhibición o la prevención de la captación de una porción alcalina **B** por una porción ácida **A** se denomina "veto" de la captación de **B**. Después de la escisión del conector **X** de modo que la porción de péptido **A** pueda separarse de la porción de péptido **B**, la porción **B** es susceptible de entrar a una célula, habiéndose eliminado el veto debido a la porción **A**. El conector escindible **X** es escindible en condiciones fisiológicas.

La porción de carga **C** que incluye un marcador o radical terapéutico de carga está anclada a la porción alcalina **B** para el transporte de una porción de carga **C** junto con **B** a una célula. Por lo tanto, la invención proporciona una molécula como se ha definido anteriormente, eficaz que mientras que la porción de péptido **A** está conectada a la porción **B**, inhibe o evita la captación de la molécula de MTS por las células. La porción ácida **A** es susceptible de vetar la captación de **B - C**. El transporte a través de una membrana celular de la porción de carga **C** conectada a la porción **B** también es inhibida o impedida por la porción ácida **A**. Después de la escisión del conector **X** de modo que porción de péptido **A** pueda separarse de la porción de péptido **B**, la porción de carga **C** conectada a la porción de péptido **B** es susceptible de entrar en una célula puesto que se ha eliminado el veto de captación debido a la porción peptídica **A**. El conector escindible **X** es escindible en condiciones fisiológicas, lo que permite el transporte de la porción de carga **C** a las células vivas. La porción de carga **C** también pueden estar anclada escindiblemente a la porción alcalina **B** de modo que la porción de carga **C** puede separarse de la porción **B** dentro de una célula.

En una realización, una molécula para transportar de forma controlada un radical de carga a través de una membrana celular incluye una molécula o material que tiene la estructura **A - X - B - C**, donde **C** comprende un radical de carga, **B** comprende una porción de péptido que tiene múltiples aminoácidos alcalinos (p. ej., entre 5 y 20, preferentemente entre 9 y 16 aminoácidos alcalinos consecutivos), estando unidos covalentemente **B** y **C**, **A** comprende una porción de péptido que tiene múltiples aminoácidos ácidos como se definió anteriormente (p. ej., entre 5 y 9, preferiblemente entre 4 y 9 aminoácidos ácidos consecutivos), y X comprende un conector escindible que une **A** y **B - C**. Cuando se conecta a **B - C**, la porción de péptido **A** es eficaz para prevenir el aumento de transporte de carga **C** a través de una membrana celular. Cuando el conector escindible **X** se escinde, la porción de péptido **A** se libera del resto de la molécula, incluyendo la liberación de la porción **B** y la porción de carga **C**. La porción de carga **C** permanece conectada a la porción **B** después de la escisión del conector escindible **X**. La porción **B** es eficaz para mejorar el transporte de carga de la porción **C** a través de una membrana celular en ausencia de la porción **A**.

En realizaciones de la invención, en moléculas que tienen el esquema A - X - B - C, los aminoácidos ácidos de la porción **A** son glutamato o aspartato. Un aminoácido ácido tiene una cadena lateral con una carga negativa a pH 6,0, y puede ser el ácido glutámico o ácido aspártico. La porción ácida **A** comprende de 5 a 9 glutamatos o aspartatos consecutivos. En realizaciones, los aminoácidos ácidos de la porción **A** son **D** aminoácidos. En realizaciones preferidas, los aminoácidos ácidos de la porción **A** son o D-glutamato, D-aspartato, o ambos.

Un aminoácido alcalino tiene una cadena lateral con una carga positiva a un pH de 6,0, y puede ser arginina, histidina, lisina, u otro aminoácido alcalino. En realizaciones de la invención, los aminoácidos alcalinos de la porción **B** son arginina, lisina o histidina. Una porción alcalina **B** que tiene múltiples aminoácidos alcalinos pueden tener entre 5 y 20, o entre 9 y 16 aminoácidos alcalinos consecutivos. En realizaciones preferidas, la porción **B** comprende de 9 a 16 argininas consecutivas. En realizaciones de la invención, los aminoácidos alcalinos de la porción **B** son **D** aminoácidos. En realizaciones preferidas, los aminoácidos alcalinos de la porción **B** son o D-arginina, D-lisina, D-histidina, o combinaciones de los mismos.

Un radical de carga puede ser cualquier molécula, material, sustancia, o constructo que pueden transportarse a una célula mediante la unión a un MTS. Una porción de carga **C** puede incluir uno o más radicales de carga. Un radical de carga puede ser, por ejemplo, un radical fluorescente, un radical de extinción de fluorescencia, un radical radiactivo, un radical radiopaco, un radical paramagnético, una nanopartícula, una vesícula, una baliza molecular, un marcador, una enzima marcadora (p. ej., peroxidasa de rábano picante (HRP), beta-galactosidasa, o cualquier otra enzima adecuada para marcar una célula), un agente de contraste (p. ej., para el diagnóstico por obtención de

imágenes), un agente quimioterapéutico, un sensibilizador a la radiación (p. ej., para la terapia de radiación), un péptido o proteína que afecta al ciclo celular, una toxina proteica, u otra carga adecuada para el transporte a una célula. En algunas realizaciones en las que **C** es un radical fluorescente, un radical de extinción de fluorescencia está anclado a la porción **A** eficaz para extinguir la fluorescencia del radical fluorescente **C** antes de la escisión del conector **X**, y eliminar la extinción del radical fluorescente **C** después de la escisión del conector **X**.

Un conector escindible **X** sirve para conectar una porción ácida **A** a una porción alcalina **B**. Un conector escindible **X** pueden incluir, por ejemplo, entre 2 y 100 átomos, o entre 6 y 30 átomos. La porción conectora escindible **X** puede incluir residuos de aminoácidos, y puede ser una conexión peptídica de entre 1 y 30, o entre 2 y 10 residuos de aminoácidos. Un conector escindible **X** adecuado para la práctica de la invención puede ser un conector flexible. En realizaciones preferidas, un conector escindible **X** adecuado para la práctica de la invención es un conector flexible, y puede ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de longitud. En realizaciones de la invención, **X** puede incluir un enlace peptídico. En algunas realizaciones preferidas de la invención, un conector escindible **X** incluye ácido aminocaproico.

Un conector escindible **X** puede estar configurado para la escisión exterior a una célula. En realizaciones preferidas de la invención, un conector escindible **X** puede estar configurado para ser escindido en condiciones asociadas con el daño o la enfermedad celular o tisular. Tales condiciones incluyen, por ejemplo, acidosis; la presencia de enzimas intracelulares (que normalmente están confinadas dentro de las células), incluyendo condiciones necróticas (p. ej., escindidas por calpaínas u otras proteasas que se vierten fuera de las células necróticas); condiciones de hipoxia, tales como un entorno reductor; trombosis (p. ej., un conector **X** puede ser escindible por la trombina o por otra enzima asociada con la cascada de coagulación de la sangre); activación del sistema inmunológico (p. ej., un conector **X** puede ser escindible por la acción de una proteína del complemento activado); u otra condición asociada con la enfermedad o lesión.

Por ejemplo, un conector escindible **X** puede estar configurado para la escisión por una enzima, tal como una metaloproteasa de la matriz. Otras enzimas que pueden escindir un conector escindible incluyen, por ejemplo, el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), enzimas lisosomales, catepsinas, antígeno específico de la próstata, proteasa de virus del Herpes simplex, proteasa de citomegalovirus, trombina, caspasa, y enzima convertora de interleucina 1 β . En realizaciones de la invención, el conector escindible **X** puede incluir la secuencia de aminoácidos PLGLAG (SEQ ID NO: 1) o puede incluir la secuencia de aminoácidos EDDDDKA (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones, un conector escindible **X** puede incluir una conexión **S - S**, o puede incluir un complejo metálico de transición que se rompe cuando se reduce el metal. Una molécula que incorpora características de la invención puede tener múltiples conectores **X** que unen una pluralidad de porciones **A** que tienen aminoácidos ácidos a una estructura **B - C**.

En realizaciones de la invención, la porción de péptido **A** se encuentra en un extremo de una cadena de polipéptido que comprende **B - C**, o comprende el extremo amino terminal de una cadena de polipéptido que comprende **B - C**. **A** puede estar conectada cerca de o en el extremo amino de una cadena de polipéptido que comprende **B - C**, o **A** pueden estar conectada cerca de o en el extremo carboxilo de una cadena de polipéptido que comprende **B - C**. La cadena de polipéptido **B - C** puede tener extremos que pueden denominarse extremo **lateral de B** y un extremo **lateral de C**. Un conector escindible **X** puede estar dispuesto cerca o en el extremo **lateral de B** terminal, o puede estar dispuesto cerca o en el extremo **lateral de C**. En realizaciones adicionales, una porción o porciones pueden ser lineales o pueden ser cíclicas. En realizaciones, una molécula cíclica que tiene las características de la invención puede tener un solo conector **X** o puede tener múltiples conectores **X**.

La invención también proporciona una molécula que comprende Q-A-X-B-C (Fórmula (II)) en donde C es un radical de carga fluorescente, Q es un radical extintor anclado a A configurado para extinguir la fluorescencia de C; B es un péptido de penetración celular con una secuencia que comprende de 5 a 20 aminoácidos alcalinos consecutivos; A es un péptido con una secuencia que comprende de 5 a 9 aminoácidos ácidos consecutivos seleccionados entre: aspartato y glutamato, que cuando se conecta a B es eficaz para inhibir o prevenir la captación celular de B - C; y X es un conector que consiste de 2 a 100 átomos que une A y B-C, configurado para su escisión en condiciones fisiológicas; en donde B está unido covalentemente a C, y en donde B es eficaz para mejorar el transporte de C a través de una membrana celular.

En realizaciones adicionales de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen la molécula de la invención que tiene péptidos susceptibles de suministro controlable de la carga a una célula y un portador adecuado. También se proporcionan métodos para producir tales péptidos susceptibles de suministro controlable de la carga a una célula, y composiciones farmacéuticas que los contienen. Se entenderá que, en realizaciones de la invención, también se pueden proporcionar peptoides, carbamatos, polímeros de vinilo, y otras moléculas, con un enlace escindible entre una porción ácida y una alcalina.

La invención también proporciona: la molécula o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en un método para controlar el suministro de C a una célula; la molécula o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en un método para controlar el suministro de C a una célula de un paciente que tiene células o tejido

enfermos; y un ácido nucleico que codifica una molécula de la invención, en donde X consiste en 1 a 10 residuos de aminoácidos; todo como se define en las reivindicaciones.

5 Las moléculas y composiciones que incorporan las características de la invención proporcionan las ventajas de controlar la captación de moléculas que contienen aminoácidos alcalinos por las células, y de controlar el suministro de la carga en las células. Tal captación controlada y suministro controlado de la carga a las células pueden ser útiles, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes que tienen células o tejidos enfermos. Por ejemplo, el suministro de un agente de contraste de formación de imágenes o un agente antiproliferativo como carga puede ser dirigido a las células cancerosas, y no a todas las células en un paciente, lo que ofrece la ventaja del suministro dirigido a las células enfermas, con el fin de permitir la obtención de imágenes no invasiva o aumentar la eficacia y disminuir los posibles efectos secundarios del tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1A es una representación esquemática de una molécula de MTS que comprende una porción alcalina B, una porción conectora X, y una porción ácida A.

20 La Figura 1B es una representación esquemática de una molécula de MTS cíclica que comprende una porción alcalina B, dos porciones conectoras X, y una porción ácida A.

La Figura 2A es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga C, una porción alcalina B, una porción conectora X, y una porción ácida A.

25 La Figura 2B es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga C, una porción alcalina B, una porción conectora X, y una porción ácida A, la conectando la porción conectora X la porción de carga.

30 La Figura 2C es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una carga C conectada a múltiples copias de moléculas de MTS que comprenden cada una una porción alcalina B, una porción conectora X, y una porción ácida A.

35 La Figura 2D es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga C, una porción alcalina B, múltiples (dos) regiones conectoras X, y una porción ácida A.

40 La Figura 2E es una representación esquemática de una molécula de MTS cíclica que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga C, una porción alcalina B, en la que dos zonas conectoras X flanquean una porción ácida A.

La Figura 2F es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga fluorescente C, una porción alcalina B, una región conectora X, y una porción ácida A que tiene un extintor Q anclado.

45 La Figura 3 es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención en la que una porción de carga C es un agente de contraste o fármaco, una porción alcalina B es una secuencia de ocho a diez residuos de D-arginina (p. ej., rrrrrrrr (SEQ ID NO: 4), una porción conectora X es un conector escindible que puede ser escindido por enzimas proteolíticas o entorno reductor que se encuentran cerca de las células cancerosas, y una porción ácida A es un dominio inhibidor que comprende D-aminoácidos.

50 La Figura 4 es una representación esquemática de una molécula de MTS de la Figura 3 que tiene las características de la invención en la que el conector escindible no se escinde cerca de tejido normal, mostrando la incapacidad de una molécula de la Figura 3 de facilitar la entrada de la carga al tejido normal.

55 La Figura 5 es una representación esquemática de una molécula de MTS de la Figura 3 que tiene las características de la invención en la que el conector escindible es escindido por enzimas proteolíticas o por el entorno reductor encontrado cerca de las células cancerosas, que muestra la capacidad de una molécula de la Figura 3 para facilitar la entrada de la carga al tejido enfermo.

60 La Figura 6A ilustra un cromatograma de una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de un péptido que tiene las características de la invención antes de la escisión de la porción conectora X que es un sustrato para la enteroquinasa.

La Figura 6B ilustra un cromatograma de HPLC del péptido de la Figura 6A después de la escisión de la porción conectora X por enteroquinasa.

5 La Figura 7A ilustra un cromatograma de HPLC de un péptido que tiene las características de la invención antes de la escisión de la porción conectora X que es un sustrato para la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2).

10 La Figura 7B ilustra un cromatograma de HPLC del péptido de la Figura 7A después de la escisión de la porción conectora X por MMP-2.

La Figura 8 ilustra la fluorescencia media medida mediante Análisis de Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS) de las poblaciones de células Jurkat incubadas durante diez minutos con moléculas de MTS que tienen las características de la invención, con radicales de carga fluorescentes.

15 La Figura 9 ilustra la fluorescencia media medida por análisis de FACS de poblaciones de células Jurkat incubadas durante diez minutos con moléculas de MTS que tienen las características de la invención, con radicales de carga fluorescentes.

20 La Figura 10 ilustra la fluorescencia media medida por análisis de FACS de poblaciones de células Jurkat incubadas durante diez minutos con moléculas de MTS que tienen las características de la invención, con radicales de carga fluorescentes.

25 La Figura 11 ilustra la fluorescencia media medida por análisis de FACS de poblaciones de células Jurkat incubadas durante diez minutos con moléculas de MTS que tienen las características de la invención, con radicales de carga fluorescentes.

La Figura 12 ilustra la fluorescencia media medida en las células Jurkat incubadas durante una hora con las moléculas de MTS de la Figura 11.

30 La Figura 13 ilustra la fluorescencia media medida en las células Jurkat incubadas durante diez minutos con moléculas de MTS que tienen un conector disulfuro que conecta una porción ácida con una porción alcalina marcada con fluorescencia, o con la porción alcalina marcada con fluorescencia solo.

35 La Figura 14 ilustra algunos radicales adecuados como parte o la totalidad de una porción de carga de una molécula de MTS que tiene las características de la invención.

La Figura 15 ilustra algunos radicales adecuados para su uso como parte o la totalidad de una porción ácida **A**.

40 La Figura 16 ilustra algunos radicales adecuados para su uso como parte o la totalidad de un conector **X**.

La Figura 17 ilustra algunos radicales adecuados para su uso como parte o la totalidad de una porción alcalina **B**.

45 La Figura 18 ilustra algunos radicales poliméricos adecuados para su uso como parte o la totalidad de una porción ácida **A**.

Descripción detallada de la invención

50 La invención proporciona una molécula que comprende A-X-B-C (Fórmula (I)), en la que C es un marcador o radical terapéutico de carga, B es un péptido de penetración celular con una secuencia que comprende de 5 a 20 aminoácidos alcalinos consecutivos; A es un péptido con una secuencia que comprende de 5 a 9 aminoácidos ácidos consecutivos seleccionados entre: aspartato y glutamato, que cuando se conecta a B es eficaz para inhibir o prevenir la captación celular de B - C; y X es un conector que consiste en 2 a 100 átomos que une A y B,
55 configurado para su escisión en condiciones fisiológicas; en donde B está unido covalentemente a C, y en donde B es eficaz para mejorar el transporte de C a través de una membrana celular. En algunas realizaciones de moléculas que tienen las características de la invención, la porción de péptido **B** incluye entre 9 y 16 aminoácidos alcalinos consecutivos, y puede ser una serie de aminoácidos alcalinos (p. ej., argininas, histidinas, lisinas, u otros aminoácidos alcalinos). En realizaciones, las moléculas que tienen las características de la invención pueden ser
60 moléculas cíclicas, como se ilustra esquemáticamente en la Fig. 2E. Por lo tanto, las moléculas de MTS que tienen las características de la invención pueden ser moléculas lineales, moléculas cíclicas, o pueden ser moléculas lineales que incluye una porción cíclica.

Como se comentó anteriormente, las moléculas que incluyen múltiples aminoácidos alcalinos, tales como una serie

de aminoácidos alcalinos, son captadas frecuentemente por las células. Sin embargo, los autores de la presente invención han descubierto que las moléculas que tienen estructuras que incluyen una porción alcalina **B**, una porción conectora **X**, y una porción ácida **A** no son captadas por las células. Una porción ácida **A** puede incluir aminoácidos que no son ácidos. La porción ácida **A** puede comprender otros radicales, tales como radicales cargados negativamente. La porción alcalina **B** puede comprender otros radicales, tales como radicales cargados positivamente. La inclusión de una porción ácida **A** es eficaz para inhibir o prevenir la captación de una porción **B** por las células. Tal bloque de captación que por otra parte podría ser efectuado por los aminoácidos alcalinos de la porción **B** puede denominarse un "veto" de la captación por la porción ácida **A**. Los autores de la presente invención han hecho el descubrimiento sorprendente además de que la escisión del conector **X**, que permite la separación de la porción **A** de la porción **B** es eficaz para permitir la captación de la porción **B** en las células.

Una estructura genérica para péptidos que tienen las características de la invención es **A - X - B - C**, donde **C** es un radical de carga, **X** un conector, **A** una porción ácida, y **B** una porción alcalina. Una porción ácida **A** puede incluir aminoácidos que no son ácidos. La porción ácida **A** puede comprender otros radicales, tales como radicales cargados negativamente. Una porción alcalina **B** puede incluir aminoácidos que no son alcalinos. La porción alcalina **B** puede comprender otros radicales, tales como radicales cargados positivamente. En realizaciones preferidas, la cantidad de carga negativa en la porción **A** es aproximadamente la misma que la cantidad de carga positiva en la porción **B**.

Un radical de carga **C** puede ser, por ejemplo, un agente de contraste para formación de imágenes de diagnóstico, o un fármaco quimioterapéutico o sensibilizador a la radiación para la terapia. **B** puede ser, por ejemplo, una porción de péptido que tiene entre 5 y 20 aminoácidos alcalinos consecutivos, tal como una serie de aminoácidos alcalinos (se prefieren las argininas, aunque son también adecuadas las histidinas, como lo son las lisinas u otros aminoácidos alcalinos). **X** es un conector escindible que puede escindirse en condiciones fisiológicas. **A** puede ser una porción de péptido que tiene entre 5 y 9 aminoácidos ácidos consecutivos, tal como una serie de aminoácidos ácidos. Los glutamatos y aspartatos son aminoácidos ácidos para la porción de péptido **A**. Una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga **C**, una porción alcalina **B**, una porción conectora **X**, y una porción ácida **A** se presenta en la Fig. 2A.

Los autores de la presente invención han hecho el sorprendente descubrimiento de que la inclusión de una porción ácida **A** también es eficaz para inhibir o prevenir la captación por las células de moléculas que combinan una porción de **B** y una porción de **C**. Los autores de la presente invención han hecho el descubrimiento adicional de que la escisión del conector **X**, que permite la separación de la porción **A** de la porción **B** es eficaz para permitir la captación de las porciones **B** y **C** por las células. Por lo tanto, el suministro de la carga **C** puede ser controlado y mejorado por moléculas que tienen las características de la invención.

Por ejemplo, cuando porción de péptido **A** contiene de 5 a 9 glutamatos o aspartatos consecutivos, y **X** es un conector flexible de 2 a 100, o de 6 a 30 átomos de longitud, la capacidad normal de una porción de péptido **B** (p. ej., una secuencia de nueve residuos de arginina consecutivos) para ocasionar la captación por las células está bloqueada. La escisión del conector **X** permite la separación de la porción **A** de la porción **B** y la porción **C**, atenuando el veto por la porción **A**. Por lo tanto, cuando se separa de **A**, se recupera la capacidad normal de la porción **B** para efectuar la captación de la carga **C** por las células. Tal captación celular se produce normalmente cerca de la ubicación del evento de escisión. Por lo tanto, el diseño del conector escindible **X** de tal manera que se escinda en o cerca de una célula diana es eficaz para la captación directa de la carga **C** por las células diana. La escisión extracelular de **X** permite la separación de **A** del resto de la molécula para permitir la captación por las células.

Una molécula de MTS que tiene las características de la invención puede tener cualquier longitud. En realizaciones de moléculas de MTS que tienen las características de la invención, una molécula puede tener de 10 a 40 aminoácidos de longitud, sin incluir la longitud de un conector **X** y una porción de carga **C**. En otras realizaciones, en particular cuando se incluyen múltiples aminoácidos no ácidos (en la porción **A**) o no alcalinos (en la porción **B**) en una o ambas de las porciones **A** y **B**, las porciones **A** y **B** de una molécula de MTS puede tener juntas 50, o 60, o 70 aminoácidos de longitud. Una porción cíclica de una MTS puede incluir de 12 a 60 aminoácidos, sin incluir la longitud de un conector **X** y una porción de carga **C**. Por ejemplo, una molécula de MTS lineal que tiene las características de la invención puede tener una porción alcalina **B** que tiene entre aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos alcalinos consecutivos (preferiblemente entre 9 y 16 aminoácidos alcalinos consecutivos) y una porción ácida **A** que tiene entre 5 y 9 aminoácidos ácidos consecutivos. En algunas realizaciones preferidas, una molécula de MTS que tiene las características de la invención puede tener una porción alcalina **B** que tiene entre 9 y 16 aminoácidos alcalinos consecutivos y entre 5 y 9 aminoácidos ácidos consecutivos.

En las células sanas, el compuesto de estructura intacta **A - X - B - C** no sería capaz de entrar en la célula debido a la presencia de la porción **A**. Por lo tanto, un proceso estrictamente intracelular para escindir **X** sería ineficaz para escindir **X** en las células sanas puesto que la porción **A**, que previene la captación por las células, no sería escindida eficazmente por las enzimas intracelulares en las células sanas, ya que no sería absorbida y no tendría acceso a

tales enzimas intracelulares. Sin embargo, cuando una célula está dañada o enferma, de manera que tales enzimas intracelulares salieran de la célula, se produciría la escisión de **A**, permitiendo la entrada de la porción **B** o **B - C** a la célula, efectuando el suministro dirigido de la porción **B** o de la porción de carga **C** a las células adyacentes.

5 Las porciones **A** y **B** pueden incluir L-aminoácidos o D-aminoácidos. En realizaciones de la invención, los D-aminoácidos son los preferidos para las porciones **A** y **B** con el fin de minimizar la inmunogenicidad y la escisión no específica por peptidasas o proteasas de fondo. Se sabe que la captación celular de secuencias de oligo-D-arginina es tan buena o mejor que la de oligo-L-argininas. La estructura genérica **-A - X - B - C** puede ser eficaz, cuando **A** está en el extremo amino y cuando **A** está en el extremo carboxi, es decir, es permisible cualquier orientación de los
10 enlaces peptídicos. Sin embargo, en realizaciones en las que **X** es un péptido escindible por una proteasa, puede ser preferible ensamblar el extremo **C** de **X** al extremo **N** de **B**, de manera que el nuevo extremo amino terminal creado por la escisión de **X** aporte una carga positiva adicional que se suma a las cargas positivas que ya están presentes en **B**.

15 La porción de carga **C** puede estar anclada a **B** en cualquier ubicación u orientación. No se necesita que una porción de carga **C** esté localizada en un extremo opuesto de la porción **B** de un conector **X**. Cualquier lugar de anclaje de **C** a **B** es aceptable siempre y cuando ese anclaje permanezca después de que se escinda **X**. Por ejemplo, una porción de carga **C** puede estar anclada a, o cerca de, un extremo de la porción **B** con el conector **X** anclado a un extremo opuesto de la porción **B** como se ilustra en las Fig. 2A y 2B. Una porción de carga **C** también puede estar anclada a,
20 o cerca de, un extremo de la porción **B** con el conector **X** anclado a o cerca del mismo extremo de la porción **B**. En algunas realizaciones de la invención, un conector **X** se puede conectar a una porción de carga **C** que está conectada a una porción alcalina **B** como se ilustra en la Fig. 2B. La Figura 2C es una representación esquemática de una molécula de MTS que tiene las características de la invención que comprende una porción de carga **C** conectada a múltiples porciones alcalinas **B**, cada una de cuyas porciones alcalinas **B** está conectada a una porción
25 conectora **X**, y a través del conector a una porción ácida **A**.

Se puede diseñar un conector **X** para que se escinda en presencia de condiciones particulares o en un entorno particular. El conector **X** es escindible en condiciones fisiológicas. La escisión de tal conector **X** puede, por ejemplo, ser mejorada o puede ser efectuada por señales patológicas particulares o un entorno particular relacionado con las
30 células en las que se desea el suministro de la carga. El diseño de un conector **X** para su escisión por condiciones específicas, tal como por una enzima específica, permite la orientación de la captación celular a una ubicación específica donde se obtienen dichas condiciones. Por lo tanto, una manera importante de que las moléculas de MTS que tienen las características de la invención proporcionen orientación específica de la captación celular a las células, tejidos o regiones deseadas es diseñando la porción conectora **X** para que sea escindida por condiciones
35 próximas a tales células, tejidos o regiones elegidos como diana. Después de la escisión de un conector **X**, las porciones **B - C** de la molécula quedan como un producto conjugado sencillo de **B** y **C**, conservando en algunos casos un fragmento relativamente pequeño, inerte que queda de una porción residual del conector **X**.

Una porción conectora **X** puede ser escindible por las condiciones que se encuentran en el entorno extracelular, tales como las condiciones ácidas que se pueden encontrar cerca de las células y tejidos cancerosos o un entorno reductor, como se puede encontrar cerca de células y tejidos hipóxicos o isquémicos; por proteasas u otras enzimas que se encuentran en la superficie de las células o liberadas cerca de las células que tienen una afección a tratar, tales como las células y tejidos enfermos, apoptóticos o necróticos; o por otras condiciones o factores. Un conector lábil en medio ácido puede ser, por ejemplo, un conector de ácido cis-aconítico. Otros ejemplos de enlaces sensibles
45 al pH incluyen acetales, cetales, amidas activadas, tales como amidas de ácido 2,3- dimetilmaleámico, éter de vinilo, otros éteres y ésteres activados tales como enol- o silil-éteres o ésteres, iminas, iminios, enaminas, carbamatos, hidrazonas y otros enlaces. Un conector **X** puede ser un aminoácido o un péptido. Un conector peptídico puede tener cualquier longitud adecuada, tal como, por ejemplo, de 3 a 30, o preferiblemente de 6 a 24 átomos en la secuencia (p. ej., un péptido lineal de 1 a 10 o preferiblemente de 2 a 8 aminoácidos de longitud). Un conector peptídico escindible puede incluir una secuencia de aminoácidos reconocida y escindida por una proteasa, de manera que la acción proteolítica de la proteasa escinda el conector **X**.

Una clase importante de señales es la actividad hidrolítica de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), que son muy importantes en la migración invasiva de las células tumorales metastásicas. También se cree que las MMP juegan un papel importante en la inflamación y el ictus. Las MMP son revisadas por Visse et al., en Circ. Res. 92: 827-839 (2003). Las MMP se pueden utilizar para escindir un conector **X** y así permitir la separación de la porción ácida **A** de las porciones **B** y **C**, lo que permite la captación celular de la carga **C** de manera que la captación celular de **C** se activa por la acción de las MMP. Tal captación está típicamente en las proximidades de las MMP que desencadenan la escisión de **X**. Por lo tanto, la captación de moléculas que tienen las características de la invención
60 es capaz de dirigir la captación celular de la carga **C** a células, tejidos o regiones específicos que tienen MMP activas en el entorno extracelular.

Por ejemplo, un conector **X** que incluye la secuencia de aminoácidos PLGLAG (SEQ ID NO: 1) puede ser escindido por la enzima metaloproteinasa MMP-2 (una MMP importante en el cáncer y la inflamación). La escisión de tal

conector **X** se produce entre los residuos centrales G y L, haciendo que la captación celular aumente de 10 a 20 veces (véase el Ejemplo 4). Mucho se sabe acerca de las preferencias de sustrato de las diferentes MMP, de modo que se pueden diseñar conectores **X** que son susceptibles de predisponer **X** para que sean preferentemente sensibles a determinadas subclases de las MMP, o a miembros individuales de la gran familia de proteinasas MMP.

5 Por ejemplo, en algunas realizaciones, son particularmente preferidos los conectores **X** diseñado para ser escindidos por las MMP ancladas a la membrana debido a que su actividad permanece localizada en la superficie exterior de la célula que las expresa. En realizaciones alternativas, se prefieren conectores **X** diseñados para ser escindidos por una MMP secretada soluble donde puede ser deseable la difusión de la carga **C** lejos de la localización exacta de la escisión, lo que aumenta la distribución espacial de la carga. Otros conectores **X** escindibles por otras MMP son comentados en el Ejemplo 9.

10 La hipoxia es una importante señal patológica. Por ejemplo, se cree que la hipoxia hace que las células cancerosas se hagan más resistentes a la radiación y la quimioterapia, y también inicia la angiogénesis. Un conector **X** adecuado para la escisión en o cerca de los tejidos que sufren de hipoxia permite dirigir la porción **B** y **C** a las células cancerosas y tejidos cancerosos, regiones del infarto, y otras regiones hipóxicas. Por ejemplo, un conector **X** que incluye un enlace disulfuro se escinde preferentemente en regiones hipóxicas y de ese modo dirige el suministro de la carga a las células en una región. En un entorno hipóxico en presencia de, por ejemplo, células perforadas o necróticas, los tioles libres y otros agentes reductores se vuelven disponibles extracelularmente, mientras que el O₂ que mantiene normalmente el entorno oxidante extracelular se agota por definición. Este desplazamiento en el equilibrio redox debe promover la reducción y la ruptura de un enlace disulfuro dentro de un conector **X**. Además de los enlaces disulfuro que se benefician de los equilibrios de tiol-disulfuro, se pueden utilizar conectores que incluyen quinonas que se desorganizan cuando se reducen a hidroquinonas en un conector **X** diseñado para escindirse en un ambiente hipóxico.

15 La necrosis a menudo conduce a la liberación de enzimas u otros contenidos de las células que pueden ser utilizados para desencadenar la escisión de un conector **X**. Un conector **X** diseñado para su escisión en las regiones de necrosis en la ausencia de hipoxia, por ejemplo, puede ser uno que es escindido por calpaínas u otras proteasas que pueden ser liberadas desde las células necróticas. Tal escisión de conectores **X** por calpaínas liberaría las porciones **B - C** conectadas de la porción **A**, permitiendo que la carga sea captada por las células enfermas y por las células adyacentes que aún no se habían vuelto totalmente permeables.

20 También se observa comúnmente acidosis en los sitios de tejido dañado o hipóxico, debido al cambio de Warburg de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaeróbica y la producción de ácido láctico. Tal acidez local podría ser detectada, bien sea utilizando un conector **X** lábil en medio ácido (p. ej., mediante la inclusión en **X** de una conexión acetal o vinil éter). Alternativamente, o además, la acidosis se puede utilizar como un desencadenante de la captación de carga mediante la sustitución de algunas de las argininas dentro de **B** por histidinas, que solo se vuelven catiónicas por debajo de pH 7.

25 Las moléculas que tienen las características de la invención son adecuadas para portar diferentes cargas, incluyendo diferentes tipos de cargas y diferentes especies de los mismos tipos de carga, para su captación por las células. Por ejemplo, los diferentes tipos de carga pueden incluir cargas marcadoras (p. ej., radicales marcadores fluorescentes o radiactivos) y cargas terapéuticas (p. ej., moléculas quimioterapéuticas tales como metotrexato o doxorubicina), u otras cargas. Cuando se requiere terapéuticamente la destrucción de las células aberrantes o enfermas, una carga terapéutica puede incluir un "agente citotóxico", es decir, una sustancia que inhiba o prevenga la función de las células y/o cause la destrucción de las células. En algunas realizaciones, una única molécula que tiene las características de la invención puede incluir más de una porción de carga **C** de manera que una porción alcalina **B** puede estar relacionada con múltiples cargas **C**. Tales múltiples cargas **C** pueden incluir cargas marcadoras, cargas terapéuticas, u otras cargas. Los radicales de carga múltiples pueden permitir, por ejemplo, el suministro tanto de un marcador radiactivo y un agente de ultrasonido o de contraste, que permite la formación de imágenes mediante diferentes modalidades. Alternativamente, por ejemplo, suministro de la carga radiactiva junto con un agente anti-canceroso, que proporciona una mayor actividad contra el cáncer, o suministro de una carga radiactiva con una carga fluorescente, que permite múltiples medios para localizar e identificar células que han captado la carga.

30 El suministro de la carga tal como una molécula fluorescente se puede utilizar para visualizar las células que tienen una cierta condición o células en una región que muestra una condición particular. Por ejemplo, la trombosis (formación de coágulos) puede ser visualizada mediante el diseño de un conector **X** que va a ser escindido por cualquiera de las muchas proteasas en la cascada de formación de coágulos de sangre para el suministro de una carga que incluye un marcador fluorescente u otro marcador a la región. Del mismo modo, la activación del complemento se puede visualizar mediante el diseño de un conector **X** que va a ser escindido por una cualquiera o más de las proteasas en las cascadas de activación del complemento para el suministro de un marcador fluorescente u otro marcador a la región. Por lo tanto, las moléculas fluorescentes son un ejemplo de un marcador que puede ser suministrado a las células y regiones diana después de la liberación de una porción de **A** tras la escisión de un conector **X**.

Una molécula que tiene las características de la invención puede incluir uno o más conectores **X** de manera que una porción ácida **A** se puede conectar a las porciones **B** y **C** por medio de una o más conexiones. Tales conexiones que se conectan a la porción **A** pueden ser a la porción **B**, a la porción **C**, o a ambas porciones **B** y **C**. Cuando una molécula que tiene las características de la invención incluye múltiples conexiones **X**, la separación de la porción **A** de las otras porciones de la molécula requiere la escisión de todas las conexiones **X**. La escisión de múltiples conectores **X** puede ser simultánea o secuencial. Las múltiples conexiones **X** pueden incluir conexiones **X** que tienen diferentes especificidades, de manera que la separación de la porción **A** de las otras porciones de la molécula que requiere más de una condición o entorno ("señales extracelulares") es experimentada por la molécula. La escisión de los múltiples conectores **X** por lo tanto sirve como un detector de las combinaciones de tales señales extracelulares. La Figura 2D muestra una molécula de MTS que tiene las características de la invención que incluye dos porciones conectoras **Xa** y **Xb** que conectan la porción alcalina **B** a la porción ácida **A**. La Figura 2E muestra una molécula de MTS cíclica que tiene las características de la invención que incluye dos regiones conectoras **Xa** y **Xb** que conectan la porción alcalina **B** con la porción ácida **A**. En las moléculas de MTS ilustradas esquemáticamente en las Figuras 2D y 2E, ambos conectores **Xa** y **Xb** deben ser escindidos antes de que la porción ácida **A** sea separada de la porción alcalina **B**, lo que permite la entrada de la porción **B** y la porción de carga **C** (si la hubiera) a una célula. Se entenderá que una región conectora se puede conectar o bien a una porción alcalina **B** o a una porción de carga **C** independientemente de otro conector que pueda estar presente, y que, cuando se desee, se pueden incluir más de dos regiones conectoras **X**.

Las combinaciones de dos o más conectores **X** se pueden utilizar para modular adicionalmente el direccionamiento y la administración de moléculas a las células, tejido o regiones deseados. Se pueden detectar las combinaciones booleanas de las señales extracelulares para ampliar o reducir la especificidad de la escisión de los conectores **X** si se deseara. Cuando se conectan múltiples conectores **X** en paralelo, la especificidad de la escisión se estrecha, ya que cada conector **X** debe ser escindido antes de que la porción **A** pueda separarse del resto de la molécula. Cuando se conectan múltiples conectores **X** en serie, la especificidad de la escisión se amplía, ya que la escisión de cualquier conector **X** permite la separación de la porción **A** del resto de la molécula. Por ejemplo, con el fin de detectar, ya sea una proteasa **O** hipoxia (es decir, para escindir **X** en presencia de proteasa o de hipoxia), se diseña un conector **X** para colocar los sitios sensibles a proteasa y sensibles a reducción en tándem, de modo que la escisión de cualquiera fuera suficiente para permitir la separación de la porción ácida **A**. Alternativamente, con el fin de detectar la presencia de una proteasa **Y** de hipoxia (es decir, para escindir **X** en presencia tanto de proteasa como de hipoxia, pero no en presencia únicamente de una), se diseña un conector **X** para colocar el sitio sensible a proteasas entre al menos un par de cisteínas que están unidas entre sí mediante disulfuro. En ese caso, se requieren la escisión por proteasa **Y** la reducción del disulfuro con el fin de permitir la separación de la porción **A**.

El hecho de que los capilares tengan a menudo fugas alrededor de los tumores y otros sitios de trauma debería mejorar la capacidad de las moléculas de alto peso molecular (p. ej., peso molecular de aproximadamente 40 kDa o más) para alcanzar el compartimento intersticial. Dado que la escisión de un conector **X** es típicamente extracelular, se espera algún marcaje circunstante, es decir, las células que no expresan la proteasa relevante, pero que son inmediatamente adyacentes a las células que expresan son propensas a recoger un poco de la carga. Para los tumores, tal direccionamiento circunstante se considera beneficioso debido a la heterogeneidad de los fenotipos celulares y el deseo de eliminar el mayor porcentaje de células sospechosas.

El hecho de que un solo mecanismo pueda mediar la captación tanto de cargas de formación de imágenes y terapéuticas será especialmente valioso, puesto que la obtención de imágenes con cantidades de trazador no perjudiciales se puede utilizar para comprobar si es probable que una dosis terapéutica subsiguiente se concentre correctamente en el tejido diana.

Se pueden utilizar D-aminoácidos en moléculas de MTS que tienen las características de la invención. Por ejemplo, algunos o todos de los péptidos de las porciones **A** y **B** puede ser D-aminoácidos en algunas realizaciones preferidas de la invención. En una realización de la invención adecuada para el suministro de un marcador detectable a una célula diana, una MTS que tiene las características de la invención incluye un agente de contraste como carga **C** anclado a una porción alcalina **B** que comprende de 8 a 10 D-argininas. La porción ácida **A** puede incluir también D-aminoácidos. Del mismo modo, se puede suministrar un fármaco a una célula por medio de tales moléculas que tienen una porción alcalina **B** que incluyen de 8 a 10 D-argininas y una porción ácida **A** que incluye D-aminoácidos ácidos. Una representación esquemática de tales moléculas de MTS se muestra en la Figura 3.

Se entenderá que una molécula de MTS que tiene las características de la invención pueden incluir aminoácidos no convencionales, tales como, por ejemplo, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, u otros aminoácidos no convencionales. Una molécula de MTS que tiene las características de la invención pueden incluir aminoácidos modificado, incluyendo aminoácidos modificados post-traduccionalmente tales como, por ejemplo, aminoácidos metilados (p. ej., metilhistidina, formas metiladas de lisina, etc.), aminoácidos acetilados, aminoácidos amidados, aminoácidos formilados, aminoácidos hidroxilados, aminoácidos fosforilados, u otros aminoácidos modificados. Una molécula de MTS que tiene las características de la invención también pueden incluir radicales miméticos de péptidos, incluyendo porciones conectadas por enlaces no peptídicos y aminoácidos conectados por o a porciones

no aminoacídicas. Por ejemplo, una molécula de MTS que tiene las características de la invención puede incluir peptoides, carbamatos, polímeros de vinilo, u otras moléculas que tienen enlaces no peptídicos pero que tienen una porción ácida escindiblemente conectada a una porción alcalina que tiene un radical de carga.

5 La porción conectora **X** se puede diseñar de forma que sea escindida, por ejemplo, por las enzimas proteolíticas o el entorno reductor, como se puede encontrar cerca de las células cancerosas. Tal entorno, o tales enzimas, no se encuentran típicamente cerca de las células normales. La Figura 4 ilustra una molécula de MTS como se muestra en la Figura 3, que tiene un conector escindible **X** diseñado para ser escindido cerca de las células cancerosas. Como se ilustra en la Figura 4, el conector escindible no se escinde cerca de tejido normal. La Figura 4 ilustra la capacidad
10 de una MTS que tiene una porción de **A** susceptible de vetar la captación celular de una porción de **B**, y de una porción de **B - C**, bloqueando de la entrada de la carga en el tejido normal.

Sin embargo, como se ilustra en la Figura 5, la porción conectora **X** puede ser escindida, por ejemplo, por las enzimas proteolíticas o por el entorno reductor que se encuentran cerca de las células cancerosas para suministrar un marcador o un fármaco a las células cancerosas. Como se muestra en la Figura 5, una molécula de MTS de la Figura 3 con un conector escindible **X** que es escindido por enzimas proteolíticas o por el entorno reductor próximo a las células cancerosas es capaz de facilitar la entrada de la carga al tejido enfermo. Por lo tanto, la escisión selectiva del conector **X** y la separación resultante de la carga **C** y la porción alcalina **B** de la porción ácida **A** permite la captación selectiva de la carga por las células que tienen las características seleccionadas (p. ej., enzimas), o localizadas cerca de, un entorno concreto. Por lo tanto, las moléculas que tienen las características de la invención son capaces de suministrar selectivamente la carga a las células diana sin hacerlo a las células normales o de otra manera no elegidas como diana.

En algunas realizaciones, la carga **C** puede ser una molécula fluorescente tal como fluoresceína. Los radicales de carga fluorescentes permiten una fácil medición mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo en células cultivadas no fijadas. Sin embargo, se ha demostrado que secuencias de oligoarginina, como las que constituyen la porción **B**, importan una muy amplia variedad de cargas **C**, que varían desde pequeñas moléculas polares a las nanopartículas y vesículas (Tung y Weissleder (2003) *Advanced Drug Delivery Reviews* 55: 281-294). Por lo tanto, en realizaciones de la invención, una porción de carga **C** puede ser cualquier radical de carga adecuado susceptible de captado por una célula mientras está conectado a una porción alcalina **B**.

Por ejemplo, para fines de obtención de imágenes *in vivo*, **C** puede estar marcado con un isótopo emisor de positrones (p. ej., ^{18}F) para la tomografía de emisión de positrones (PET), isótopo de rayos gamma (p. ej., $^{99\text{m}}\text{Tc}$) para la tomografía computarizada de emisión de único fotón (SPECT), una molécula paramagnética o nanopartícula (p. ej., quelato de Gd^{3+} o de nanopartícula de magnetita recubierta) para la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), un fluoróforo del infrarrojo cercano para la formación de imágenes en el infrarrojo cercano (IR cercano), una luciferasa (luciérnaga, bacteriana, o de celentéreos) u otra molécula luminiscente para la obtención de imágenes de bioluminiscencia, o una vesícula cargada con perfluorocarbono para ultrasonido. Para fines terapéuticos, por ejemplo, las clases adecuadas de carga incluyen, pero no se limitan a: a) agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina, mitomicina, paclitaxel, mostazas nitrogenadas, etopósido, camptotecina, 5-fluorouracilo, etc.; b) agentes sensibilizantes a la radiación, tales como porfirinas para la terapia fotodinámica, o agrupaciones de ^{10}B o ^{157}Gd para la terapia por captura de neutrones; o c) péptidos o proteínas que modulan la apoptosis, el ciclo celular, u otras cascadas de señalización cruciales. Los fármacos quimioterapéuticos existentes pueden ser utilizados, aunque pueden no ser ideales, debido a que ya han sido seleccionadas por cierta capacidad para entrar en las células por su propia cuenta. En las realizaciones de las moléculas de la invención, se pueden preferir las cargas que no pueden entrar o salir de las células sin la ayuda de la porción polibásica **B**.

La carga **C** puede incluir un radical radiactivo, por ejemplo, un isótopo radiactivo tal como ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P isótopos radiactivos de Lu, y otros.

La porción de carga **C** puede incluir un radical fluorescente, tal como una proteína fluorescente, péptido, o molécula de colorante fluorescente. Las clases comunes de colorantes fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, xantenos tales como rodaminas, rodoles y fluoresceínas, y sus derivados; bimanos; cumarinas y sus derivados, tales como cumarinas de umbeliferona y aminometilo; aminos aromáticas tales como dansilo; colorantes de escuarato; benzofuranos; cianinas fluorescentes; carbazoles; dicianometilpiranos, polimetina, oxabenzantrano, xanteno, pirilio, carbostilo, perileno, acridona, quinacridona, rubreno, antraceno, coroneno, fenantreno, pireno, butadieno, estilbenos, complejos quelato metálicos de lantánidos, complejos quelatos metálicos de tierras raras, y derivados de estos colorantes. Se comentan colorantes fluorescentes, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.452.720, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.227.487 y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.543.295.

Una porción de carga **C** puede incluir un colorante de fluoresceína. Los colorantes de fluoresceína típicos incluyen, pero no se limitan a, 5-carboxifluoresceína, 5-isotiocianato de fluoresceína y 6-carboxifluoresceína; los ejemplos de otros colorantes de fluoresceína se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.008.379, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.750.409, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.066.580 y la

Patente de Estados Unidos Núm. 4.439.356. Una porción de carga **C** puede incluir un colorante de rodamina, tal como, por ejemplo, 6-isotiocianato de tetrametil-rodamina, 5-carboxitetrametil-rodamina, derivados de 5-carboxi rhodol, tetrametil- y tetraetil- rodamina, difenildimetil- y difenildietil- rodamina, dinaftil-rodamina, cloruro de sulfonil-rodamina 101 (vendido bajo el nombre comercial de rojo Texas[®]), y otros colorantes de rodamina. Otros colorantes de rodamina se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.080.852, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.025.505, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.936.087, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.750.409. Una porción de carga **C** puede incluir un colorante de cianina, tal como, por ejemplo, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

Algunos de los compuestos anteriores o sus derivados producirán fosforescencia además de fluorescencia, o producirán únicamente fosforescencia. Algunos compuestos fosforescentes incluyen porfirinas, ftalocianinas, compuestos poliaromáticos tales como pirenos, antracenos y acenaftenos, y así sucesivamente, y pueden ser, o pueden estar incluidos en, una porción de carga **C**. Una porción de carga **C** también puede ser o incluir un extintor de fluorescencia, tal como, por ejemplo, un grupo ácido (4-dimetilamino-fenilazo)benzoico (DABCYL).

Se puede conectar un par de compuestos para formar una baliza molecular, que tiene regiones complementarias con un fluoróforo y un extintor de fluorescencia asociados entre sí para que la fluorescencia del fluoróforo sea extinguida por el extintor. Una o ambas de las regiones complementarias pueden ser parte de la porción de carga **C**. Cuando solo una de las regiones complementarias (p. ej., el radical fluorescente) es parte de la porción de carga **C**, y cuando el radical extintor es parte del conector **X** o de la porción ácida **A**, la escisión del conector **X** permitirá la fluorescencia de la porción fluorescente y detección de la escisión. Tras la captación celular, la porción fluorescente de una baliza molecular permitirá la detección de la célula. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 2F, se puede anclar un extintor **Q** a una porción ácida **A** para formar una molécula de MTS que tiene las características de la invención **Q - A - X - B - C** donde la carga **C** es fluorescente y es extinguida mediante **Q**. La extinción de **C** por **Q** se mitiga tras la escisión de **X**, lo que permite el marcaje fluorescente de una célula que capta la porción **B - C**. La combinación de des-extinción de la fluorescencia y captación selectiva debería aumentar el contraste entre los tejidos capaces de escindir **X** en comparación con los que no pueden escindir **X**.

La carga **C** puede incluir un radical quimioterapéutico, tal como un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, u otro radical terapéutico, tal como un agente útil en el tratamiento de tejido isquémico, o de tejido necrótico, u otro agente terapéutico.

Las moléculas de MTS que tienen las características de la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de síntesis convencionales, tales como, por ejemplo, la síntesis en fase sólida que incluye la síntesis de péptidos en fase sólida. Un ejemplo de la síntesis de péptidos utilizando Fmoc se proporciona en el Ejemplo 1 a continuación. Por ejemplo, los métodos de fase sólida convencionales para la síntesis de péptidos pueden comenzar con anhídridos de aminoácidos protegidos en N-alfa que se preparan en forma cristalizada o se preparan nuevamente en solución, y se utilizan para la adición de aminoácidos sucesivos al extremo N-terminal. En cada adición de residuo, el péptido en crecimiento (en un soporte sólido) es tratado con ácido para eliminar el grupo protector de N-alfa-, se lava varias veces para eliminar el ácido residual y para promover la accesibilidad del extremo del péptido al medio de reacción. El péptido se hace reaccionar a continuación con un anhídrido simétrico de aminoácido N-prottegido activado, y se lava el soporte sólido. En cada etapa de adición de residuo, la reacción de adición de aminoácidos se puede repetir para un total de dos o tres reacciones de adición separadas, para aumentar el porcentaje de crecimiento de moléculas de péptido que se hacen reaccionar. Típicamente, se utilizan 1 a 2 ciclos de reacción para las primeras doce adiciones de residuos, y de 2 a 3 ciclos de reacción para los residuos restantes.

Después de completar las cadenas de péptidos en crecimiento, la resina de péptido protegida se trata con un ácido fuerte tal como ácido fluorhídrico líquido o ácido trifluoroacético para desbloquear y liberar los péptidos del soporte. Para la preparación de un péptido amidado, se selecciona el soporte de resina utilizado en la síntesis para suministrar una amida C-terminal, después de la escisión del péptido de la resina. Después de la eliminación del ácido fuerte, el péptido puede ser extraído en una solución de ácido acético 1 M y liofilizado. El péptido se puede aislar mediante una separación inicial mediante filtración en gel, para eliminar los dímeros de péptidos y los polímeros de mayor peso molecular, y también para eliminar las sales no deseadas. El péptido parcialmente purificado se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía HPLC preparativa, y la pureza y la identidad del péptido se puede confirmar mediante análisis de la composición de aminoácidos, espectrometría de masas y mediante HPLC analítica (p. ej., en dos sistemas disolventes diferentes).

La invención también proporciona polinucleótidos que codifican moléculas de MTS de la invención. El término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxinucleótidos, o formas modificadas de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas individuales y de doble cadena de ADN. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, por ejemplo, un vector de expresión; a un plásmido o virus de replicación autónoma; o al ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como una molécula separada (p. ej., un ADNc) independiente de otras secuencias.

Estos polinucleótidos incluyen ADN, ADNc, y secuencias de ARN que codifican las moléculas de MTS que tienen las características de la invención, o porciones de las mismas. Se pueden producir porciones de péptidos por medios recombinantes, incluyendo síntesis mediante polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada. Tales polinucleótidos también pueden incluir secuencias promotoras y otras secuencias, y se pueden incorporar a un vector para su transfección (que puede ser estable o transitoria) a una célula anfitriona.

La construcción de vectores de expresión y la expresión de genes en células transfectadas implican el uso de mecanismos de clonación molecular que son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., , Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., Eds., (Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Suplemento más reciente). Los ácidos nucleicos utilizados para transfectar células con secuencias que codifican la expresión del polipéptido de interés generalmente estarán en forma de un vector de expresión que incluye secuencias de control de la expresión conectadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la expresión del polipéptido. Según se utiliza en la presente memoria, "conectada operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control conectada operativamente a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. "Secuencia de control" se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificantes y no codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañeros de fusión. En la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos que codifica la expresión de un polipéptido se refiere a una secuencia que, después de la transcripción y la traducción del ARNm, produce el polipéptido. Esto puede incluir secuencias que contienen, por ejemplo, intrones. Según se utiliza en la presente memoria, el término "secuencias de control de la expresión" se refiere a secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la que están conectadas operativamente. Las secuencias de control de expresión están unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, intensificadores, terminadores de transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) delante de un gen que codifica la proteína, señales de corte y empalme para intrones, el mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción apropiada del ARNm, y codones de parada apropiados.

Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante del indicador fluorescente y señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación in vivo/recombinación genética. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Maniatis, et al., en Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989). La transformación de una célula anfitriona con ADN recombinante puede realizarse por medio de mecanismos convencionales que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cuando el anfitrión es procarionta, tal como E. coli, pueden prepararse células competentes que son capaces de captar ADN a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y posteriormente tratadas mediante el método de CaCl₂ por procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se pueden utilizar MgCl₂ o RbCl. La transformación también puede realizarse después de formar un protoplasto de la célula anfitriona o mediante electroporación.

Cuando el anfitrión es un eucariota, se pueden utilizar métodos de transfección de ADN tales como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido englobado en liposomas, o vectores de virus. Las células eucariotas también se pueden cotransfectar con secuencias de ADN que codifican el polipéptido de la invención, y una segunda molécula de ADN foráneo que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina quinasa del herpes simple. Otro método es utilizar un vector viral eucariótico, tal como el virus de simio 40 (SV40) o virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente células eucariotas y expresar la proteína. (Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Las técnicas para el aislamiento y la purificación de polipéptidos de la invención expresados en procariontas o eucariotas pueden ser por cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como las que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales o antígeno.

Se entenderá que los compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticamente útiles. Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos de MTS que tiene las características de la invención, y que tiene una porción de carga C que es, por ejemplo, un radical terapéutico, se pueden combinar en una mezcla con un vehículo

portador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y su formulación, inclusiva de otras proteínas humanas, p. ej., albúmina de suero humano, se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad eficaz de los compuestos del presente documento junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de preparar composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración eficaz. Las dosis y regímenes de dosificación se pueden determinar para las indicaciones y compuestos mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo la determinación (p. ej., en animales de experimentación) de la dosis eficaz que hace que la mitad de los pacientes tratados responda al tratamiento (DE_{50}), proporcionando una intervalo de dosis a los animales o sujetos de experimentación y tomando nota de las respuestas. En los siguientes ejemplos, las moléculas que no caen dentro del alcance de la invención están modificadas con un asterisco.

Ejemplo 1

Síntesis de péptido

Se sintetizaron diversos péptidos cuya captación celular podría ser modulada. En lo sucesivo, los siguientes símbolos, cuando se usen, se utilizan con los significados indicados: Fl = fluoresceína; aca = conector de ácido aminocaproico ($-\text{HN}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$), C = L-cisteína, E = L-glutamato, R = L-arginina, D = L-aspartato, K = L-lisina, A = L-alanina, r = D-arginina, c = D-cisteína, e = D-glutamato, P = L-prolina, L = L-leucina, G = glicina, V = valina, I = isoleucina, M = metionina, F = fenilalanina, Y = tirosina, W = triptófano, H = histidina, Q = glutamina, N = arginina, S = serina, y T = treonina. En las secuencias mencionadas a continuación, las letras minúsculas indican el isómero D del aminoácido.

Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos (Pioneer Peptide Synthesis System de Applied Biosystems) utilizando el método de síntesis en fase sólida y los aminoácidos Fmoc, las resinas, y los otros reactivos asequibles comercialmente. Los péptidos se escindieron con TFA/tioanisol/triisopropilsilano o TFA/tioanisol/triisopropilsilano/etanoditiol. Los péptidos se marcaron con éster succinimidilílico de 5- (y 6-) carboxifluoresceína en el grupo amino del péptido o con 5-yodoacetamidofluoresceína en el grupo tiol del péptido. El péptido bruto se purificó mediante HPLC y se liofilizó durante la noche. Cada composición de péptido se confirmó por espectrometría de masas.

Ejemplo 2

Escisión del péptido por enteroquinasas

Se añadieron 10 μl de péptido 10,38 mM disuelto en una solución de partida de agua a 10 μl de Enteroquinasa de 1 U/ μl (Invitrogen, EKmax) y el progreso de escisión se verificó mediante la inyección de 5 μl de la mezcla de reacción en HPLC monitorizada a 440 nm. El péptido se diseñó para que fuera un sustrato para la enteroquinasa, esperándose la escisión por la enteroquinasa entre los residuos K y A. Un cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del péptido EDDDDKA-aca-R₉-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 3) (antes de la escisión de la porción conectora entre K y A) se ilustra en la Figura 6A. (El término "R₉" Indica una secuencia de nueve argininas). Los cromatogramas de HPLC mostraron que el péptido se escindió casi completamente después de un tiempo de reacción de 15 min. La Figura 6B ilustra el cromatograma de HPLC del péptido de la Figura 6A después de la escisión por la enteroquinasa. Se recogió el nuevo pico y determinó en un espectrómetro de masas. La masa determinada correspondía (como se esperaba) a la escisión entre K y A en la secuencia de EDDDDKAaca-R₉-aca-C(F1)-CONH₂. (SEQ ID NO: 3)

Ejemplo 3

Péptidos que tienen porciones ácidas para vetar la captación

Se sintetizaron y se sometieron a ensayo moléculas de péptido que tiene las características de la invención, que tienen radicales de carga fluorescentes conectados a porciones alcalinas (que tiene múltiples residuos de arginina), estando conectadas estas últimas por conectores escindibles a una porción ácida (que tiene múltiples residuos de glutamato), para determinar la capacidad de suministro de la carga a las células. Los péptidos que muestran capacidad de los oligoglutamatos para vetar la captación celular mediada por oligoarginina incluyen:

F1-aca-CRRRRRRRRR-aca-EEEEEEEEEC-CONH₂ (lineal o cíclico, 5-47) (SEQ ID NO: 5)
F1-aca-CEEEE-aca-RRRRRRRRRC-CONH₂ (lineal o cíclico, 6-10) (SEQ ID NO: 6*)

Los péptidos que muestran captación dependiente de la escisión incluyen:

H₂N-EEEEEDDDDKA-aca-RRRRRRRRR-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 7) (6 a 14, sustrato de enteroquinasa, escindido después de DDDDK)

H₂N-EDDDDKA-aca-RRRRRRRRR-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 8) (6-16, sustrato de enteroquinasa)
 H₂N-EEEEEDDDDKARRRRRRRRR-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 9) (6-27, sustrato de enteroquinasa)
 H₂N-EEDDDDKA-aca-arrarr-aca-C(F1)-CON-H₂ (SEQ ID NO: 10) (6-29, sustrato de enteroquinasa)
 H₂N-DDDDDDK_A.RRRRRRRR-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 11) (7-2, sustrato de enteroquinasa)
 H₂N-EEDDDDICAR-aca-RR-aca-RR-aca-RR-aca-RR-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 12*) (7-4, sustrato de enteroquinasa)
 H₂N-eeeeee-aca-PLGLAG-rrrrrrrr-aca-c(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 13) (7-6, sustrato de MMP-2, escindido entre PLG y LAG)

10 Ejemplo 4

Péptido escindido por metaloproteinasa de la matriz 2 (MMP-2):

15 La MMP-2 (5 µg en 88 µl) fue activada a partir de proenzima fibroblastos sinoviales reumatoides humanos (Invitrogen) en tampón Tris-HCl como describen Stricklin et al (1983) en Biochemistry 22: 61 y Marcy et al (1991) Biochemistry) 30: 6476), a continuación se incubó con 32 µl de solución de partida de péptido 0,5 mM durante una hora a temperatura ambiente. La Figura 7A ilustra un cromatograma de HPLC del péptido sustrato antes de la escisión por MMP-2. El progreso de la escisión enzimática se controló mediante HPLC a una absorbancia de 215 nm. La Figura 7B es un cromatograma de HPLC del péptido después de la escisión por MMP-2, que muestra la conversión completa en una nueva especie.

Ejemplo 5

Análisis FACS de la captación celular:

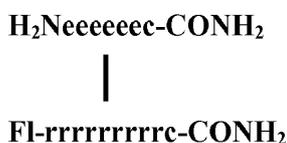
25 Se cultivaron células Jurkat de tipo salvaje de la línea de células T humanas en medio RPMI 1640 con suero de ternera fetal desactivado (FBS) al 10% (v/v) y alcanzaron una densidad de ~1x10⁶ células/ml. El medio se cambió por medio de nueva aportación un día antes de ser utilizado. Antes del experimento, las células Jurkat se lavaron con tampón HBSS tres veces y se resuspendieron en HBSS a una densidad de (0,5 -1) x 10⁶ células/ml. En el experimento de captación celular, las células se tiñeron con el péptido 1 µM o compuesto a temperatura ambiente durante 10 min, después se lavaron dos veces con HBSS frío y se sometieron a análisis FACS. La captación celular se controló mediante fluorescencia a 530 nm ejecutada en FACS y se registraron 5.000-10.000 eventos a partir de las células consideradas sanas por dispersión delantera y lateral. Los datos representan la fluorescencia media de la población celular registrada lo que indica la captación de los compuestos marcados con fluorescencia. En la mayoría de los experimentos, se incluyó F1-GGR₁₀-CONH₂ (abreviado como "R10" en los gráficos; SEQ ID NO: 49) como control positivo para la captación.

La fluorescencia media medida en las células Jurkat incubadas durante diez minutos con los péptidos indicados (cada uno con radicales de carga fluorescentes) se muestra en las Figuras 8, 9 y 10.

40 Como se muestra en la Figura 9, los compuestos 6-14 (SEQ ID NO: 7) y 6-16 (SEQ ID NO: 8) mostraron mucha más fluorescencia, lo que indica mucha más captación, de la forma escindida de los péptidos que los péptidos intactos. Del mismo modo, como se muestra en la Figura 10, los compuestos 7-2 (SEQ ID NO: 11) y 7-6 (SEQ ID NO: 13) también mostraron mucha más fluorescencia después de la escisión en comparación con la fluorescencia de los compuestos no escindidos. Por lo tanto, estos resultados demuestran la prevención de la captación celular de los compuestos que tienen aminoácidos alcalinos conectados a una porción ácida. Además, estos resultados demuestran una mayor captación celular de las porciones fluorescentes de estos péptidos (que tienen aminoácidos alcalinos) después de la escisión de las porciones ácidas.

50 Tal captación celular aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación. La Figura 11 ilustra la fluorescencia media medida en células Jurkat incubadas durante diez minutos con los péptidos indicados que tienen radicales de carga fluorescentes, porciones alcalinas y ácidas, y porciones conectoras escindibles. Como se muestra en la Figura 12, la fluorescencia media medida en células Jurkat incubadas durante una hora aumentó en comparación con la fluorescencia medida como se muestra en la Figura 11.

55 La capacidad de las moléculas de MTS que tienen conectores disulfuro X para proporcionar un suministro controlado de una porción de carga se sometió a ensayo utilizando el péptido 7-45 (SEQ ID NO: 14) que tiene la estructura



60

en la que un enlace disulfuro entre las dos cisteínas conecta la porción ácida **H₂N-eeeeeeec-CONH₂** (SEQ ID NO: 15) a la porción alcalina **FI-rrrrrrrrrc-CONH₂** (SEQ ID NO: 16). La porción alcalina porta la porción de carga, el radical F1 fluorescente (fluoresceína). Como se ilustra en la Figura 13, la fluorescencia media medida en células Jurkat incubadas durante diez minutos con el péptido 7-45 intacto (SEQ ID NO: 14) mostraron sólo una pequeña cantidad de fluorescencia por encima de la del fondo medida a partir de células Jurkat solas. Sin embargo, cuando el péptido se redujo con tris(carboxietil)fosfina 25 mM y 2-mercaptoetanosulfonato 250 mM durante 15 minutos, que escinden el conector disulfuro **X**, después se incubó con células Jurkat durante diez minutos, la fluorescencia captada por las células fue comparable a la de las células incubadas durante 10 minutos en presencia de R10. Por lo tanto, una molécula de MTS que tiene las características de la invención, con un conector disulfuro **X**, es capaz de proporcionar un suministro controlado de la porción de la carga a las células.

Ejemplo 6

Moléculas MTS que tienen diversas longitudes

Las moléculas de MTS que tienen las características de la invención pueden tener diferentes números de aminoácidos alcalinos, diferentes números de aminoácidos ácidos, y diferentes conectores. En este Ejemplo se presentan algunos ejemplos de diferentes moléculas de MTS que ilustran las características de la invención, en el que un radical fluorescente de carga se ilustra mediante fluoresceína (F1), un radical de carga radiactivo se ilustra mediante ¹²⁵I, y una carga terapéutica mediante la doxorubicina (DOX).

EDA-aca-R₅-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 17*); EDDDDKA-aca-R₆-aca-C(DOX)-CONH₂ (SEQ ID NO: 18) EEEDDDEEEDA-aca-R₉-aca-Y(¹²⁵I)-CONH₂ (SEQ ID NO: 19)
 ededdAAeeeeDDDDKA-aca-R₁₁-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 20)
 eddedededDDDDKA-aca-R₆-AGA- R₆-aca-C(DOX)-CONH₂ (SEQ ID NO: 21)
 Ggedgddeeeeeeddeed-aca-PLGLAG-aca- R₈-AAA-R₁₂-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 22)
 eeddeeddKA-aca-R₇-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 23)
 eDDDDKA-aca-RGRGRRR-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 24*)
 eddddeeeee-aca-PLGLAGKA-aca-R₁₀-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 25)
 eeeeeeeeeeeee-aca-DDDDKA-aca-R₂₀-aca-C(F1)-CONH₂ (SEQ ID NO: 26)
 eeeeeeeedddd-aca-DDDDKA-aca-R¹⁷-aca-Y(¹²⁵I)-CONH₂ (SEQ ID NO: 27)
 ddddddddddddd-aca-PLGLAG-aca-R₁₄-aca-C(DOX)-CONH₂ (SEQ ID NO: 28)

Ejemplo 7

Ejemplos de moléculas adecuadas para su uso como radicales de carga

Los ejemplos de moléculas adecuadas para su anclaje como radicales de carga a una porción alcalina **B** de una molécula de MTS que tiene las características de la invención se ilustran en la Figura 14. Las diferentes moléculas ilustrativas mostradas en la Figura 14 se marcan cada una con una letra identificadora en paréntesis. Se muestran moléculas que tienen un enlace que termina en un punto; el enlace que termina en un punto puede ser utilizado para anclar la molécula de carga a una porción alcalina **B**. Una letra entre corchetes cerca del enlace punteado indica un átomo adecuado al que podría unirse la molécula de carga; por ejemplo, [N] indica que la molécula de carga puede unirse a un nitrógeno, tal como un nitrógeno de un grupo amino epsilon de la lisina, o un nitrógeno de un grupo amino alfa de un esqueleto peptídico de la molécula de MTS. Una [S] indica una conexión a un átomo de azufre, tal como un átomo de azufre de la cisteína.

Se puede anclar más de una de estas moléculas de carga ilustrativas a una porción alcalina **B**, y las porciones alcalinas **B** que portan múltiples moléculas de carga puede tener más de un tipo de molécula de carga anclada. Las moléculas de carga pueden formar parte de estructuras más complejas. Por ejemplo, el círculo oscuro en el radical de carga marcado (**k**) representa una partícula que incluye un núcleo de óxido de hierro superparamagnético, con camisa de dextrano aminado entrecruzado (tales partículas tienen típicamente un radio de unos 22 nanómetros). Aunque solo se muestra un grupo colgante, dichas partículas pueden tener varios grupos colgantes (por lo general aproximadamente 4 a aproximadamente 20).

Ejemplo 8

Ejemplos de radicales ácidos adecuados para su inclusión en una porción ácida A

Una porción ácida A puede incluir radicales ácidos tales como los ilustrados en la Figura 15. Dichos radicales pueden estar conectados a un conector **X** y a una porción ácida **A** por enlaces peptídicos, enlaces disulfuro, u otros enlaces. Una línea discontinua en la ilustración indica un posible punto de anclaje. En esta y las siguientes figuras, un radical entre corchetes indica un motivo que se puede repetir, con una letra (p. ej., "x") que indica el número de veces que el motivo se puede repetir (que puede adoptar varios valores posibles, típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100, preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20). Se

entenderá que tales radicales ácidos se pueden anclar a una porción ácida **A** de cualquier manera adecuada. En realizaciones, una porción ácida **A** de una molécula de MTS que tiene las características de la invención pueden estar en parte compuesta de, o principalmente compuesto de, o esencialmente completamente compuesta de radicales ácidos tales como los ilustrados en la Figura 15.

- 5 Ejemplo 9
- Ejemplos de radicales conectores
- 10 Los conectores adecuados para uso en una molécula de MTS que tiene las características de la invención pueden ser péptidos u otras moléculas escindibles por enzimas en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, los conectores pueden ser escindibles por enzimas tales como metaloproteasas. Los conectores escindibles por MMP-2 se han comentado anteriormente. Además, por ejemplo, también son adecuados conectores escindibles por otras metaloproteasas, tales como MMP-9, MMP-11 y MMP-14. Por ejemplo, el péptido conector escindible por MMP-9
- 15 puede incluir la secuencia peptídica
PR (S/T) (L/I) (S/T) (SEQ ID NO: 29)
donde las letras entre paréntesis indican que uno cualquiera de los aminoácidos indicados puede estar en esa posición en la secuencia. Un conector peptídico escindible por MMP-11 puede incluir la secuencia peptídica
GGAANLVRGG (SEQ ID NO: 30)
- 20 y el conector peptídico escindible por MMP-14 (MT1-MMP) pueden incluir la secuencia peptídica
SGRIGFLRTA (SEQ ID NO: 31).
Un conector peptídico escindible por el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) puede incluir la secuencia peptídica
SGRSA (SEQ ID NO: 32)
- 25 Un conector peptídico escindible por enzimas lisosómicas puede incluir una o más de las secuencias peptídicas
GFLG (SEQ ID NO: 33),
ALAL (SEQ ID NO: 34), y FK.
- Un conector peptídico puede ser escindible por una catepsina. Por ejemplo, un conector escindible por catepsina B
- 30 puede incluir una secuencia KK o RR, o puede incluir ambas, donde la escisión típicamente se produciría entre las lisinas o las argininas. Un conector peptídico escindible por catepsina D puede incluir la secuencia peptídica
PIC (Et) F-F (SEQ ID NO: 35),
donde C(Et) indica S-etilcisteína (una cisteína con un grupo etilo anclado al tiol) y el "-" indica el sitio de escisión típico en ésta y en secuencias posteriores. Un conector peptídico escindible por catepsina K puede incluir la
- 35 secuencia peptídica
GGPRGLPG (SEQ ID NO: 36).
- Un conector peptídico escindible por antígeno específico de la próstata puede incluir la secuencia peptídica
HSSKLQ- (SEQ ID NO: 37).
- 40 Un conector peptídico escindible por proteasa del virus Herpes simplex puede incluir la secuencia peptídica
LVLA-SSSFGY (SEQ ID NO: 38).
- Un conector peptídico escindible por la proteasa del VIH puede incluir la secuencia peptídica
- 45 GVSQNY-PIVG (SEQ ID NO: 39).
- Un conector peptídico escindible por proteasa citomegalovirus puede incluir la secuencia peptídica
GVVQA-SCRLA (SEQ ID NO: 40)
- 50 Un conector peptídico escindible por la trombina puede incluir la secuencia peptídica
f(Pip)R-S (SEQ ID NO: 41)
donde "f" indica D-fenilalanina y "Pip" indica ácido piperidin-2-carboxílico (ácido pipecolínico, un análogo de prolina que tiene un anillo de seis miembros).
- 55 Un conector peptídico escindible por Caspasa-3 puede incluir la secuencia peptídica
DEV D-(SEQ ID NO: 42).
- Un conector peptídico escindible por interleucina 113 la enzima de conversión puede incluir la secuencia peptídica
- 60 GWEHD-G (SEQ ID NO: 43).
- Además, los conectores adecuados para su uso en una molécula de MTS que tiene las características de la invención pueden ser escindibles por agentes distintos de proteasas en condiciones fisiológicas. Los conectores pueden ser también moléculas no peptídicas. Algunos ejemplos de radicales escindibles enzimáticamente y no enzimáticamente adecuados como conectores se ilustran en la Figura 16. Los ejemplos de diferentes conectores

escindibles se muestran junto con una indicación de las condiciones que conducen a la escisión. Por ejemplo, la escisión del conector marcado (a) puede ser realizada por la beta-lactamasa. La escisión del conector marcado (b) se puede realizar por exposición a la luz, tal como un solo fotón de luz violeta o dos fotones de luz infrarroja. La escisión del conector marcado (c) se puede producir en condiciones reductoras. La escisión de los conectores marcados (d) y (e) se puede producir en condiciones ácidas. La acción de una esterasa puede escindir el conector marcado (f), y una fosfatasa puede escindir el conector marcado (g).

Ejemplo 10

10 Ejemplos de radicales alcalinos adecuados para su inclusión en una porción alcalina B

Una porción alcalina **B** puede incluir radicales alcalinos tales como los ilustrados en la Figura 17. Tales radicales **B** se pueden conectar a un conector X, a la carga C, o a otra parte de una porción alcalina **B** mediante enlaces peptídicos, enlaces disulfuro, u otros enlaces. Un punto indica un posible punto de anclaje, mientras que una letra encerrada entre corchetes indica un posible átomo en el que se puede realizar tal anclaje (p. ej., [S] indica que un enlace, tal como un enlace disulfuro, se puede establecer con un átomo de azufre; un [N] indica que se puede establecer un enlace con un nitrógeno). Se entenderá que tales radicales alcalinos se pueden anclar a una porción alcalina **B** u otras porciones de una molécula de MTS de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la "X" mostrada en el compuesto (c) de la Fig. 17 indica la unión de un conector **X** a la cadena lateral de un residuo de D-lisina. La porción aminoacídica del compuesto (c) de la Fig. 17 es SEQ ID NO: 44; la porción aminoacídica del compuesto (d) de la Fig. 17 es SEQ ID NO: 45; la porción aminoacídica del compuesto (e) de la Fig. 17 es el SEQ ID NO: 46; y la porción aminoacídica del compuesto (f) de la Fig. 17 es el SEQ ID NO: 47. En realizaciones, una porción alcalina **B** de una molécula de MTS que tiene las características de la invención puede estar compuesta en parte de, o puede estar compuesta principalmente de o esencialmente completamente compuesta de radicales alcalinos tales como los ilustrados en la Figura 17.

Se entenderá que algunas combinaciones de **A** y **B** pueden ser más adecuadas que otras. Por ejemplo, se prefiere que la misma estructura del esqueleto esté presente en ambas porciones **A** y **B** en una molécula de MTS que tiene las características de la invención, de modo que, por ejemplo, tanto **A** como **B** son péptidos, o tanto **A** como **B** son peptoides, o tanto **A** como **B** son los carbamatos. También se prefiere que el valor absoluto de la carga neta de una porción sea similar, o el mismo que, el valor absoluto de la carga neta de la otra porción de manera que, por ejemplo, **A** tenga aproximadamente el mismo número de cargas negativas como cargas positivas tenga **B**.

Ejemplo 11

35 Ejemplos de porciones ácidas poliméricas

En otra realización, una porción ácida **A** puede incluir o ser parte de un polímero. En realizaciones preferidas, el polímero tiene un peso molecular medio de aproximadamente 50 kDa o más. Tales pesos moleculares elevados reducen la inmunogenicidad y mejoran la farmacodinámica ralentizando la excreción y alargando el tiempo de residencia en el torrente sanguíneo. Además, los polímeros de dicho tamaño se aprovechan de la "permeabilidad y retención mejoradas" (EPR) en los tumores, cuyos capilares son mucho más permeables que el tejido normal y cuyo drenaje linfático a menudo resulta deteriorado. Estas propiedades hacen que los polímeros tengan mayores razones de concentraciones en el tumor frente al tejido normal que las de los fármacos de bajo peso molecular. Para comentarios recientes sobre los beneficios de los portadores poliméricos, véase Release Kopecek et al (2001) J. Controlled 74: 147-158; Luo y Prestwich (2002) Current Cancer Drug Targets 2: 209-226; Maeda et al (2003) International Immunopharmacology 3: 319-328; y Torchilin y Lukyanov (2003) Drug Discovery Today 8: 259-266. Este efecto de EPR que conduce al aumento de la concentración en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal debe reforzar adicionalmente la selectividad tumoral resultante de la escisión preferente del conector **X** de las moléculas MTS que tienen las características de la invención por las enzimas o bajo las condiciones que se encuentran cerca de los tumores. La escisión de **X** es eficaz para liberar la porción alcalina **B** y la carga **C** anclada a **B** de una porción ácida polimérica **A**, lo que permite la captación de **B** y **C** por las células. En realizaciones preferidas, el polímero porta un número suficiente de cargas negativas para vetar la captación de **B** y **C** mientras que el conector **X** sigue intacto. Ejemplos de tales polímeros se muestran en la Figura 18. La porción aminoacídica del compuesto (c) de la Fig. 18 es el SEQ ID NO: 48.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Regents of the University of California

<120> péptidos cuya captación por las células es controlable

<130> N.98090 PJC

ES 2 589 917 T3

Glu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Xaa Xaa

<210> 4

5 <400> 4
000

<210> 5
<211> 22

10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 5-47, péptido de oligoglutamato que veta la captación celular mediada por oligoarginina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

20 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico) modificado por fluoresceína (FI)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

25 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)

30 <223> Xaa = cisteinamida

<400> 5

Xaa Cys Arg Xaa Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Xaa
 20

35 <210> 6
<211> 17

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 6-10, péptido de oligoglutamato que veta la captación celular mediada por oligoarginina

45 <220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico) modificado por fluoresceína (FI)

50 <220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

55 <220>

<221> MOD_RES

<222> (17)

ES 2 589 917 T3

<223> Xaa = cisteinamida

<400> 6

Xaa Cys Glu Glu Glu Glu Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Xaa

5

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 6-14, péptido que muestra captación celular dependiente de la escisión del sustrato por enteroquinasa

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)

<223> Xaa = cisteinamida modificada por fluoresceína (FI)

30

<400> 7

Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Xaa Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Xaa Xaa
 20

35

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 6-16, péptido que muestra captación celular dependiente de la escisión del sustrato por enteroquinasa

45

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

50

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

55

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)

<223> Xaa = cisteinamida modificada por fluoresceína (FI)

<400> 8

ES 2 589 917 T3

Glu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Xaa Xaa

<210> 9

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 6-27, péptido que muestra captación celular dependiente de la escisión del sustrato por enteroquinasa

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)

15 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)

20 <223> Xaa = cisteinamida modificada por fluoresceína (FI)

<400> 9

Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Xaa Xaa
 20

25 <210> 10

<400> 10
 000

30 <210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 7-2, péptido que muestra captación celular dependiente de la escisión del sustrato por enteroquinasa

40 <220>

<221> MOD_RES

<222> (18)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

45 <220>

<221> MOD_RES

<222> (19)

<223> Xaa = cisteinamida modificada por fluoresceína (FI)

50 <400> 11

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Lys Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Xaa Xaa

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

ES 2 589 917 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido 7-4, péptido que muestra captación celular dependiente de la escisión del sustrato por enteroquinasa

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)

<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)

<223> Xaa = cisteinamida modificada por fluoresceína (FI)

35

<400> 12

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa
 1 5 10 15

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
 20

40 <210> 13

<400> 13
 000

45 <210> 14

<400> 14
 000

50 <210> 15

<400> 15
 000

55 <210> 16

<400> 16
 000

60 <210> 17

ES 2 589 917 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de traslocación de la membrana (MTS)

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (4)
 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (10)
 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

<220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (11)
 <223> Xaa = cisteinamida modificada por fluoresceína (FI)

<400> 17

25 Glu Asp Ala Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de traslocación de la membrana (MTS)

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)
 <223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Xaa = cisteinamida modificada por doxorubicina (DOX)

50 <400> 18

 Glu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Arg Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de traslocación de la membrana (MTS)

<220>

ES 2 589 917 T3

<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (22)
<223> Xaa = ácido aminohexanoico (ácido aminocaproico)

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (23)
<223> Xaa = tirosinamida modificada por I-125

15 <400> 19

Glu Glu Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu Asp Ala Xaa Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Arg Arg Arg Arg Arg Xaa Xaa
20

20 <210> 20

<400> 20
000

25 <210> 21

<400> 21
000

30 <210> 22

<400> 22
000

35 <210> 23

<400> 23
000

40 <210> 24

<400> 24
000

45 <210> 25

<400> 25
000

50 <210> 26

<400> 26
000
<210> 27

55 <400> 27
000

<210> 28

60 <400> 28

ES 2 589 917 T3

000

<210> 29
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido conector escindible por la metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP-9)
 10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)
 15 <223> Xaa = Ser o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)
 20 <223> Xaa = Leu o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)
 25 <223> Xaa = Ser o Thr

<400> 29

Pro Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5

30

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la metaloproteinasa 11 de la matriz (MMP-11)
 40

<400> 30

Gly Gly Ala Ala Asn Leu Val Arg Gly Gly
 1 5 10

45

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la metaloproteinasa 14 de la matriz (MMP-14)
 50

<400> 31

Ser Gly Arg Ile Gly Phe Leu Arg Thr Ala
 1 5 10

55

<210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

ES 2 589 917 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido conector escindible por el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA)

5 <400> 32

Ser Gly Arg Ser Ala
1 5

<210> 33

10 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por enzimas lisosomales

<400> 33

Gly Phe Leu Gly
1

20

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por enzimas lisosomales

<400> 34

30

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 35

35 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la catepsina D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

45 <223> Xaa = S-etilcisteína

<400> 35

Pro Ile Xaa Phe Phe
1 5

50

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la catepsina K

<400> 36

Gly Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly
1 5

60

ES 2 589 917 T3

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por antígeno específico de la próstata

<400> 37

10

His Ser Ser Lys Leu Gln
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la proteasa del virus herpes simplex

20

<400> 38

Leu Val Leu Ala Ser Ser Ser Phe Gly Tyr
1 5 10

25

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la proteasa del VIH

<400> 39

Gly Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gly
1 5 10

35

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la proteasa de Citomegalovirus

45

<400> 40

Gly Val Val Gln Ala Ser Cys Arg Leu Ala
1 5 10

50

<210> 41

<400> 41
000

<210> 42
<211> 4

55

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la caspasa-3

60

ES 2 589 917 T3

<400> 42

Asp Glu Val Asp
1

5 <210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector peptídico escindible por la enzima conversora de interleucina 1beta

<400> 43

15
Gly Trp Glu His Asp Gly
1 5

<210> 44

20 <400> 44
000

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción aminoacídica del compuesto (d) de la Figura 17

30 <400> 45

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Tyr
1 5 10

35 <210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción aminoacídica del compuesto (e) de la Figura 17

<400> 46

45 Ile Arg Arg Arg Lys Lys Leu Arg Arg Leu Lys
1 5 10

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Porción aminoacídica del compuesto (f) de la Figura 17, R9, Arg9, porción peptídica B, secuencia de captación

55 <400> 47

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

60 <210> 48

ES 2 589 917 T3

- <400> 48
000
- 5 <210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de translocación de membrana de control positivo fluorescente (MTS) para la captación, abreviada "R10"
- <220>
15 <221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Xaa = Gly modificada por fluoresceína (FI)
- <220>
20 <221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Xaa = argininamida
- <400> 49
25
- | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Gly | Arg | Xaa |
| | 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | |
- <210> 50
<211> 16
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción alcalina B
- 35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(16)
<223> La Arg de las posiciones 10-16 puede estar presente o ausente
- 40 <400> 50
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | |
- 45 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción ácida A
- <220>
55 <221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Xaa = sulfoserina
- <220>
60 <221> MOD_RES
<222> (9)
<223> Xaa = glutamatamina anclada a la molécula de carga unida a nitrógeno

ES 2 589 917 T3

<400> 51

Glu Glu Glu Xaa Glu Glu Glu Glu Xaa
1 5

5 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción ácida A

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (9)
<223> Xaa = tirosina anclada a la molécula de carga unida a nitrógeno

<400> 52

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Xaa
1 5

20 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción ácida A

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Xaa = tetrafluorotirosina

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> Xaa = ácido glutámico anclado a la molécula de carga unida a nitrógeno

40 <400> 53

Glu Glu Xaa Glu Glu Ala Glu Glu Xaa
1 5

45 <210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción alcalina B

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
55 <223> Xaa = 2'-sulfo-acetamido-isoleucina anclada a la molécula de carga conectada a azufre

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
60 <223> Xaa = lisina unida a la molécula de carga unida a nitrógeno

ES 2 589 917 T3

<400> 54

Xaa Arg Arg Arg Lys Lys Leu Arg Arg Leu Xaa
1 5 10

5 <210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: porción alcalina B

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (1)
<223> Xaa = lisinamida anclada a través de la molécula de carga unida a nitrógeno alfa y épsilon

<220>
<221> MOD_RES
20 <222> (10)
<223> Xaa = dodecaheptil-arginina

<400> 55

Xaa Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Xaa
1 5 10

25 <210> 56
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sitio de escisión del sustrato por enteroquinasa

35 <400> 56

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

40

17. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición farmacéutica de la reivindicación 15, para su uso en un método para controlar el suministro de C a una célula de un paciente que tiene células o tejido enfermo.

5 18. Un ácido nucleico que codifica una molécula de la reivindicación 1, en donde X consiste en 1 a 10 residuos de aminoácidos.

19. Una molécula que comprende la fórmula (II):

10 Q-A-X-B-C Fórmula (II)

en donde

15 C es un radical de carga fluorescente,
Q es un radical extintor anclado a A configurado para extinguir la fluorescencia de C;
B es un péptido de penetración celular con una secuencia que comprende de 5 a 20 aminoácidos alcalinos consecutivos;

20 A es un péptido con una secuencia que comprende de 5 a 9 aminoácidos ácidos consecutivos seleccionados entre: aspartato y glutamato, que cuando se conecta a B es eficaz para inhibir o prevenir la captación celular de B - C; y

X es un conector que consiste en 2 a 100 átomos que une A y B-C, configurado para su escisión en condiciones fisiológicas;

25 en donde B está conectado covalentemente a C, y en donde B es eficaz para mejorar el transporte de C a través de una membrana celular.

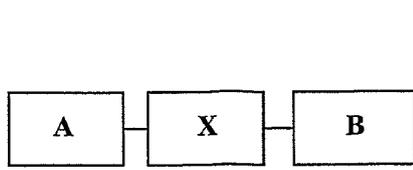


Figura 1A

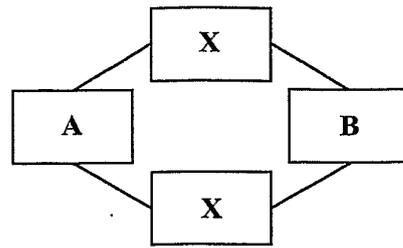


Figura 1B



Figura 2A



Figura 2B

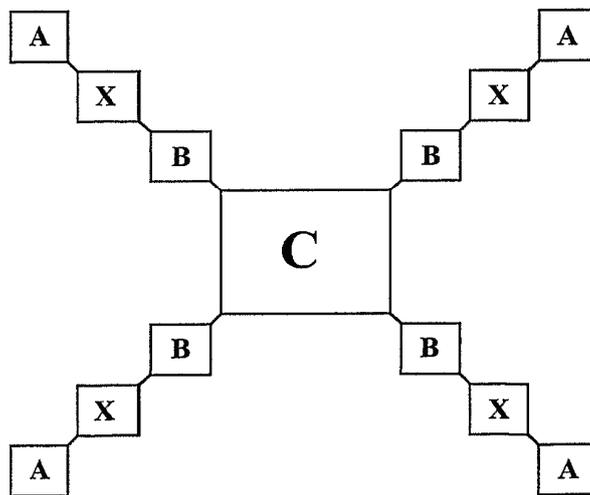


Figura 2C

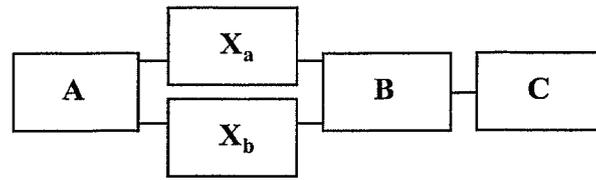


Figura 2D

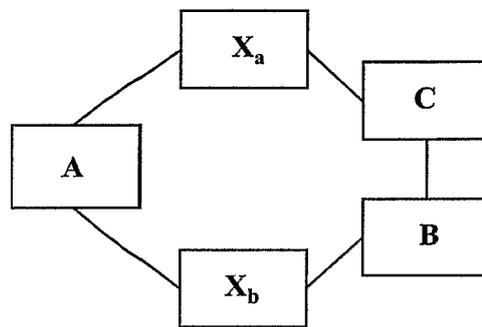


Figura 2E

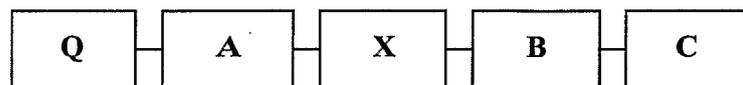


Figura 2F

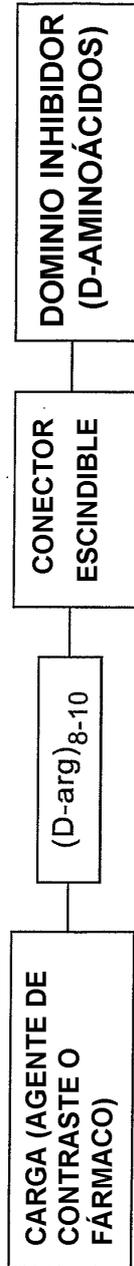


Figura 3

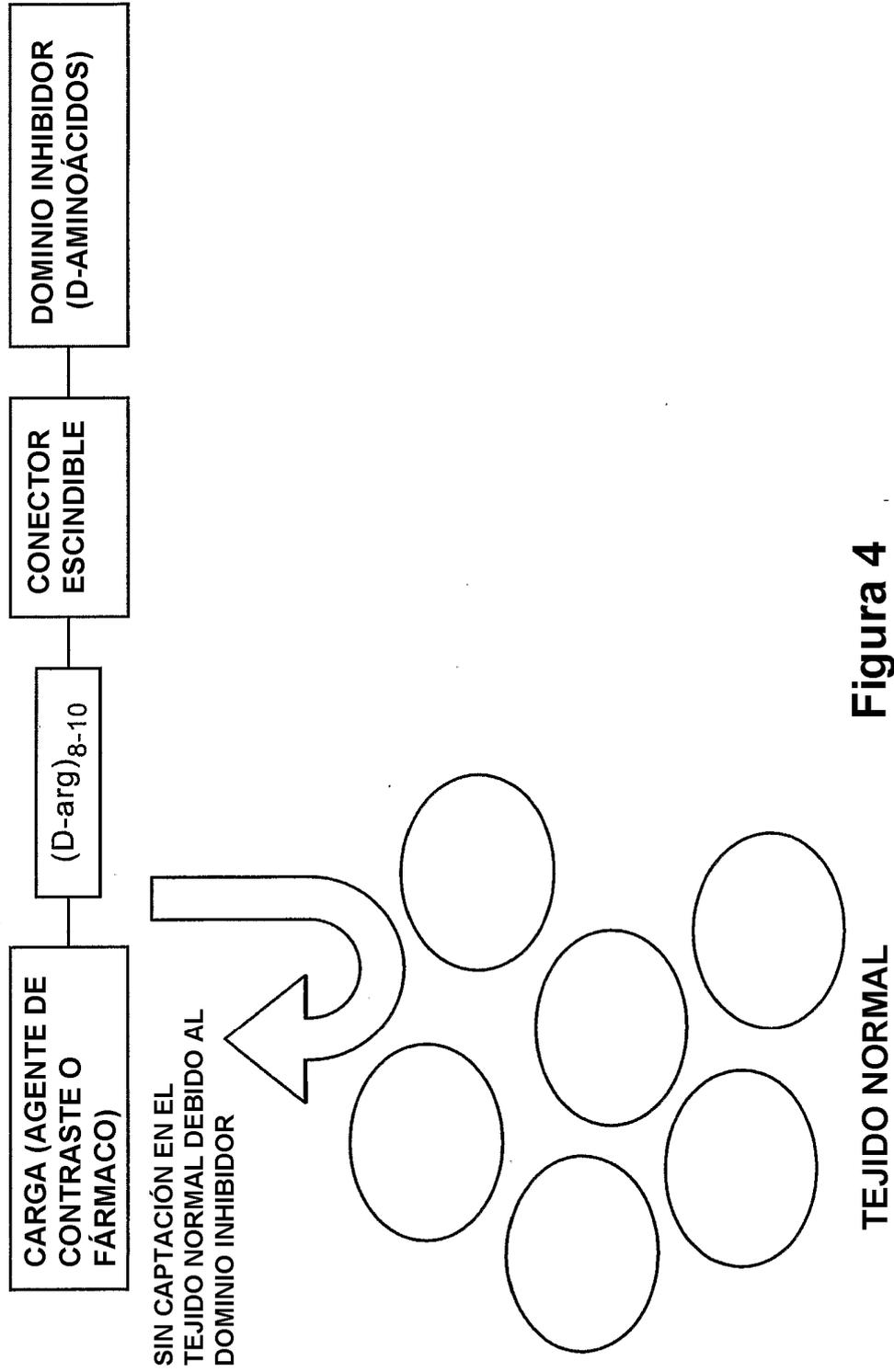


Figura 4

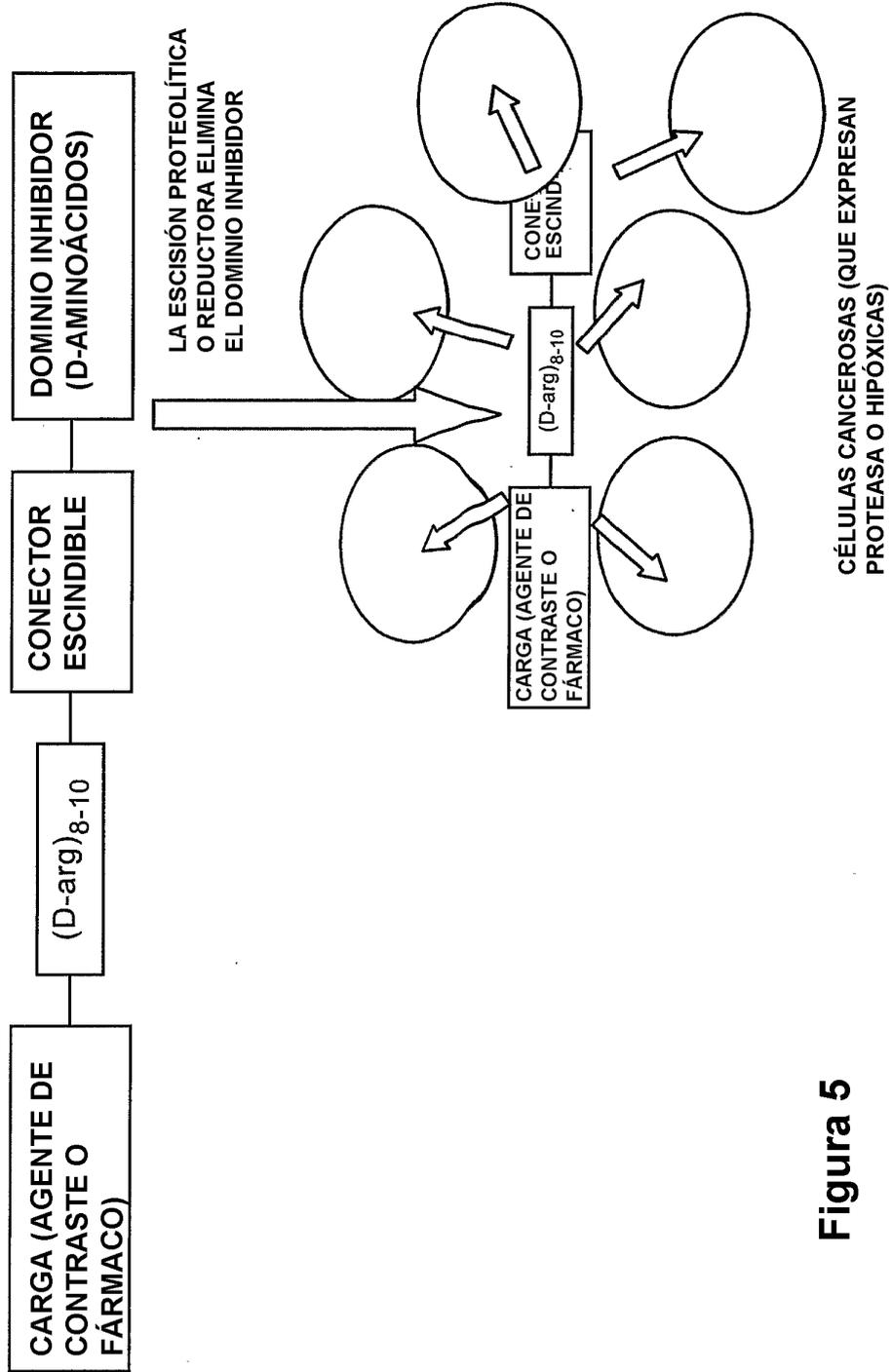
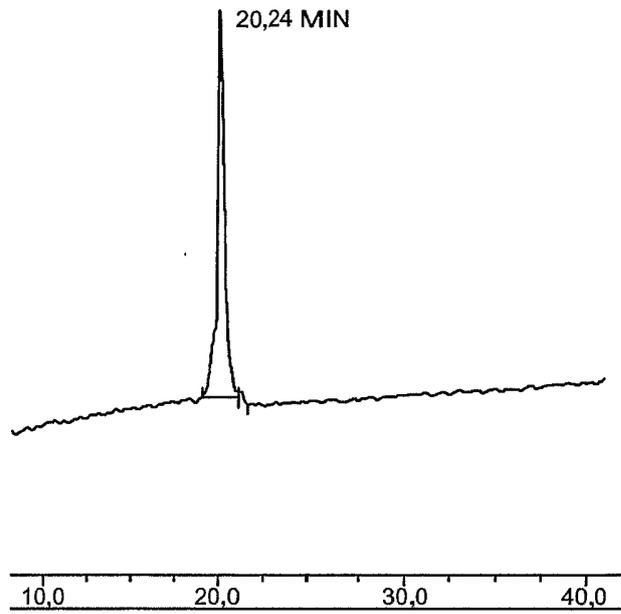
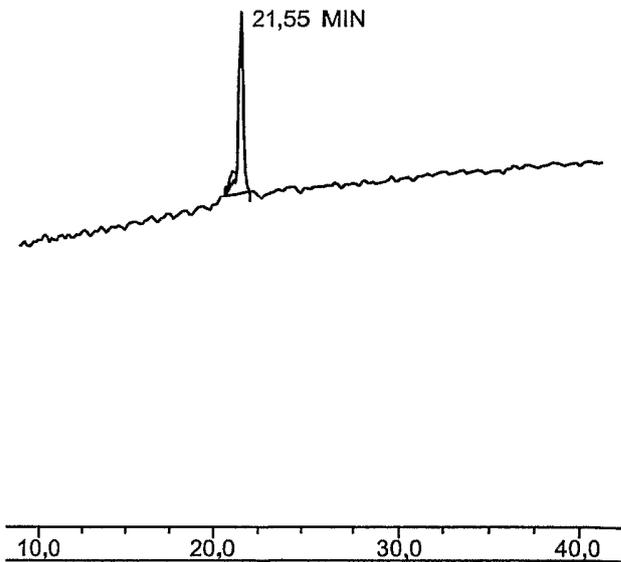


Figura 5



6A

DESPUÉS DE LA ESCISIÓN POR ENTEROQUINASA:



6B

ANTES DE LA ESCISIÓN POR MMP2:

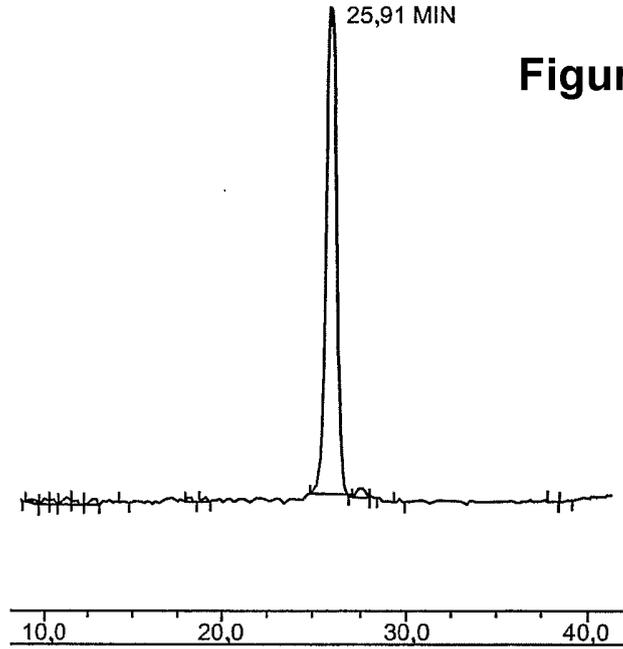


Figura 7A

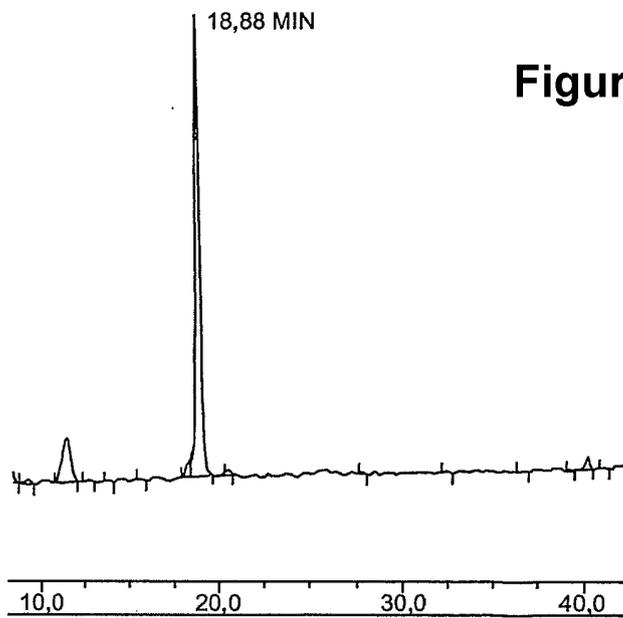


Figura 7B

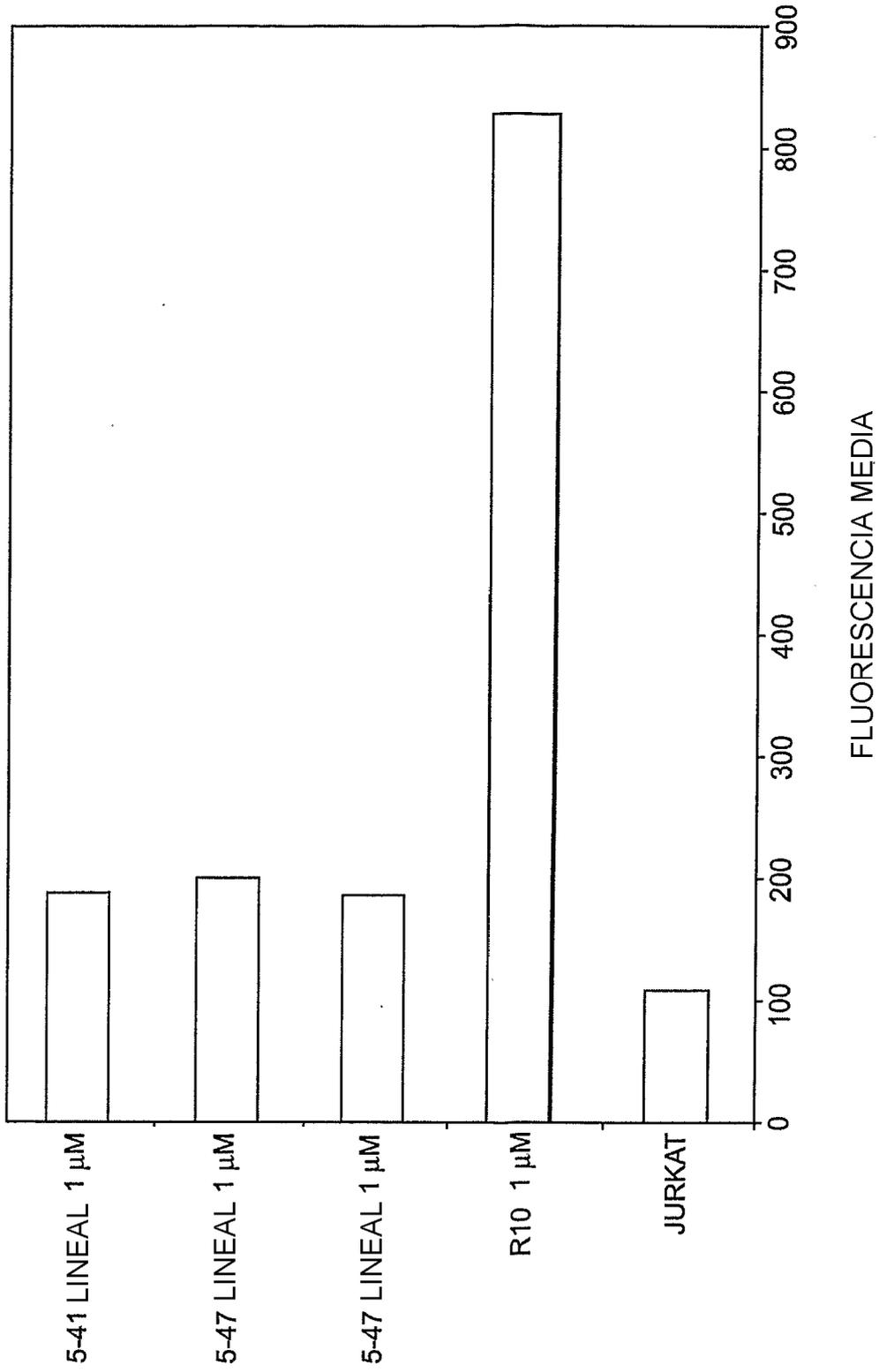


Figura 8

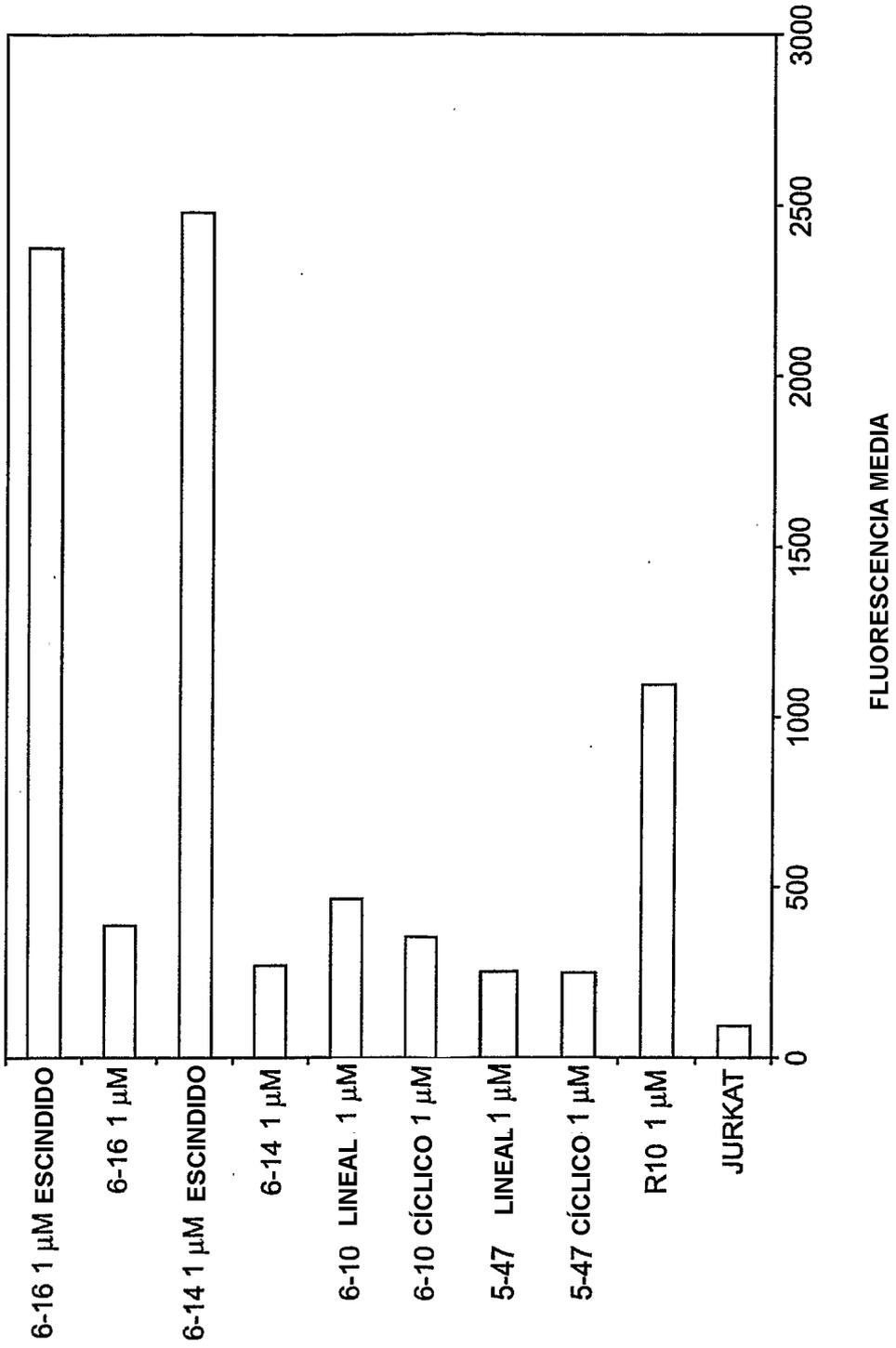


Figura 9

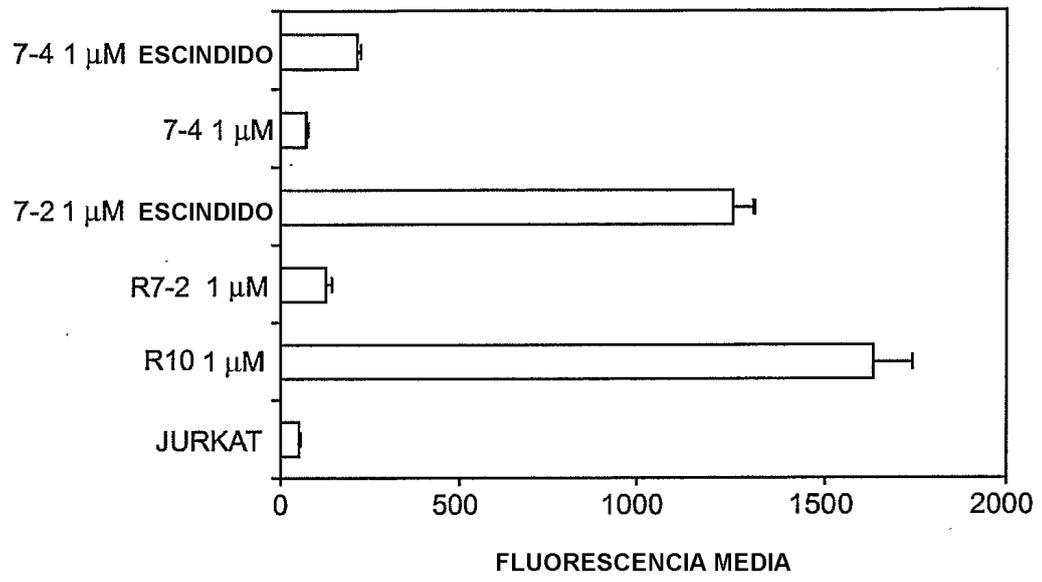


Figura 10

PÉPTIDO 1 μ M INCUBADO CON JURKAT A TEMP. AMBIENTE DURANTE 1 MIN.

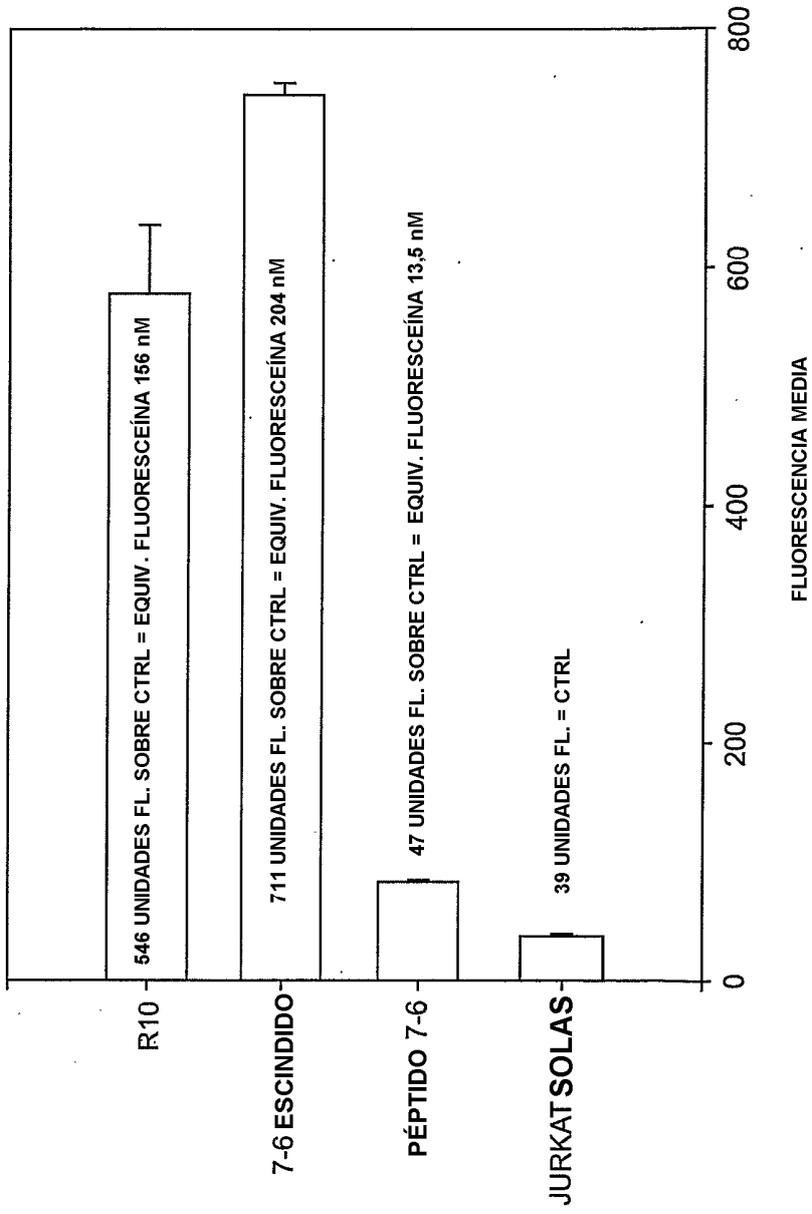


Figura 11

PÉPTIDO 1 μ M INCUBADO CON JURKAT A TEMP. AMBIENTE DURANTE 60 MIN.

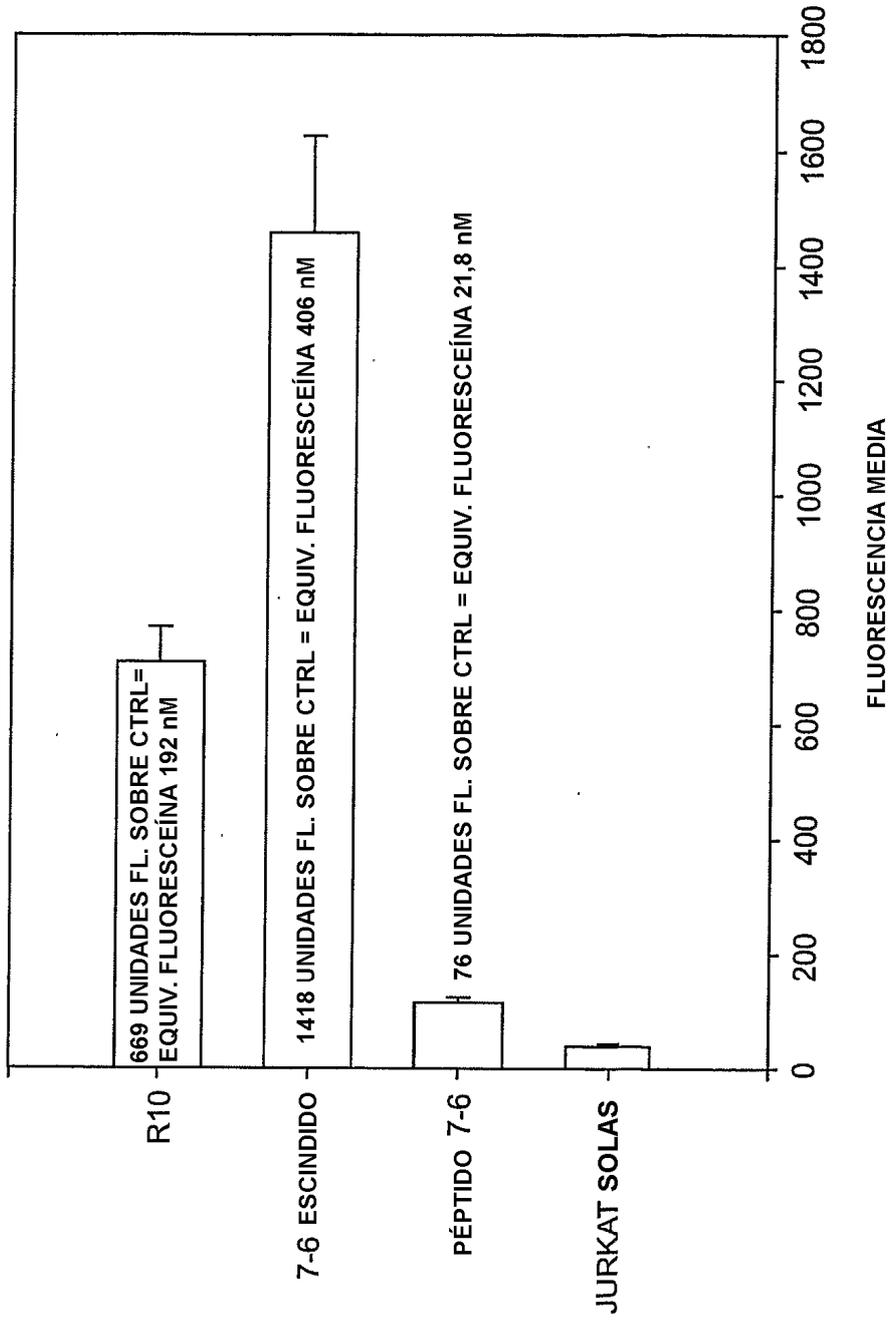
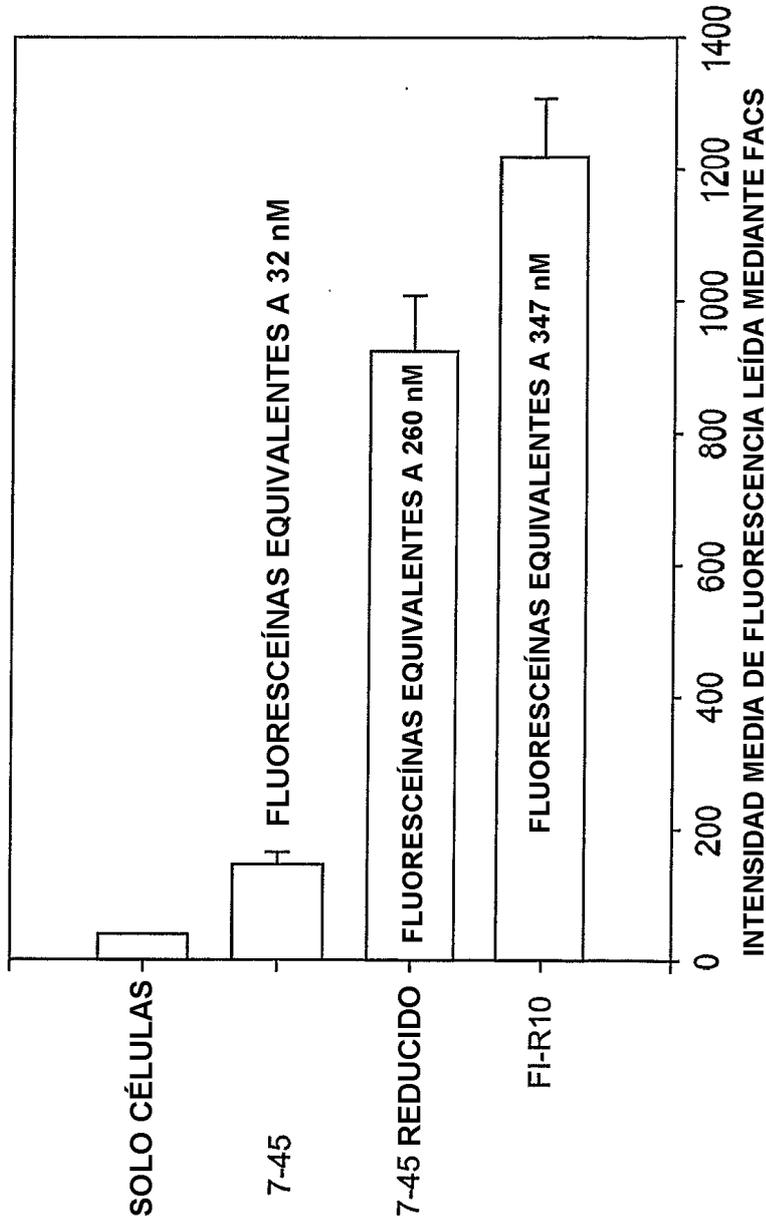
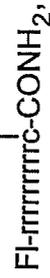


Figura 12

ANÁLISIS FACS DE LA CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO 7-45 POR JURKAT
DESPUÉS DE 10 MIN. DE INCUBACIÓN CON PÉPTIDOS 1 µM



EL PÉPTIDO 7-45 ES H₂N-eeeeec-CONH₂ DONDE LA LÍNEA CONTINUA INDICA UN ENLACE DISULFURO



LA REDUCCIÓN DEBE PRODUCIR DOS PÉPTIDOS SEPARADOS, DE LOS CUALES SOLO FI-rrrrrrrrc-CONH₂ ES DETECTABLE MEDIANTE FLUORESCENCIA **Figura 13**

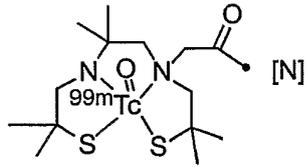


Figura 14a

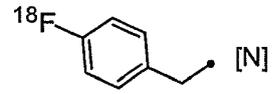


Figura 14d

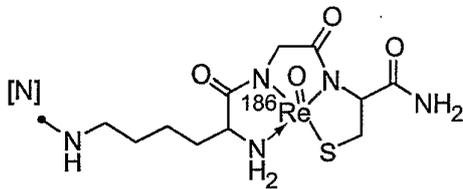


Figura 14b

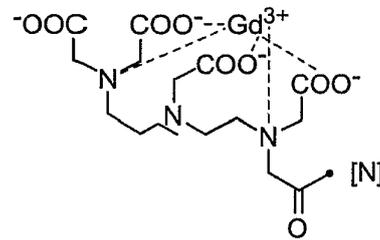


Figura 14e

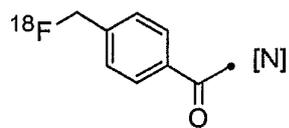


Figura 14c

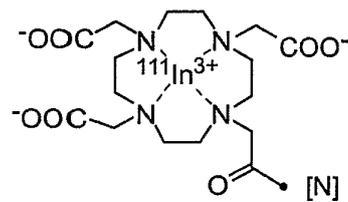


Figura 14f

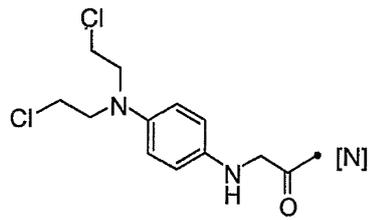


Figura 14g

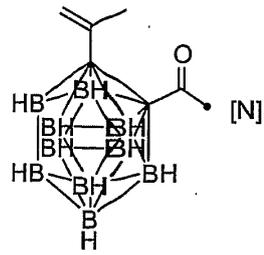


Figura 14h

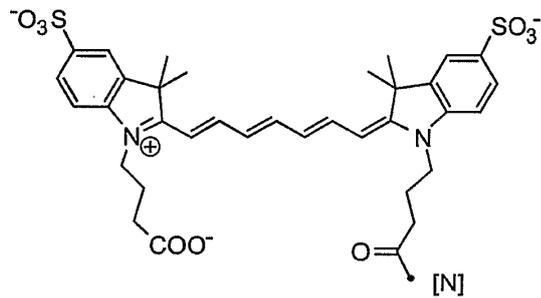


Figura 14i

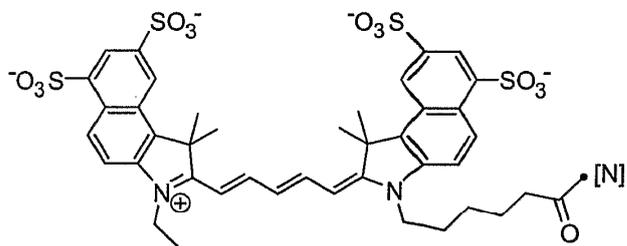


Figura 14j

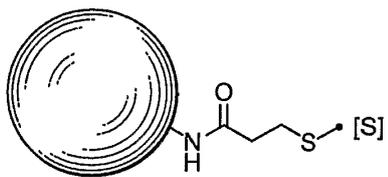


Figura 14k

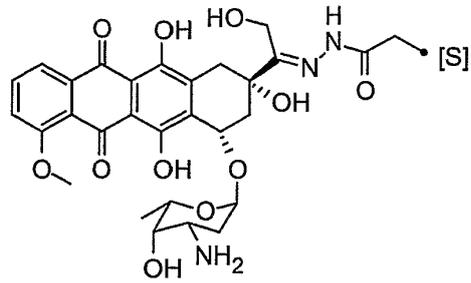


Figura 14l

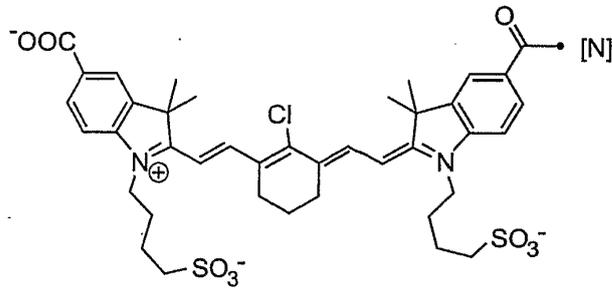


Figura 14m

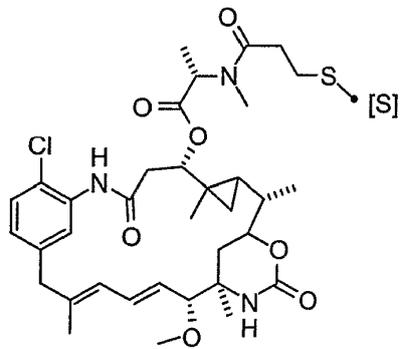


Figura 14n

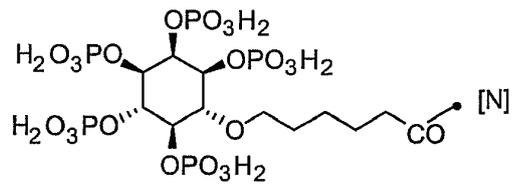


Figura 15a

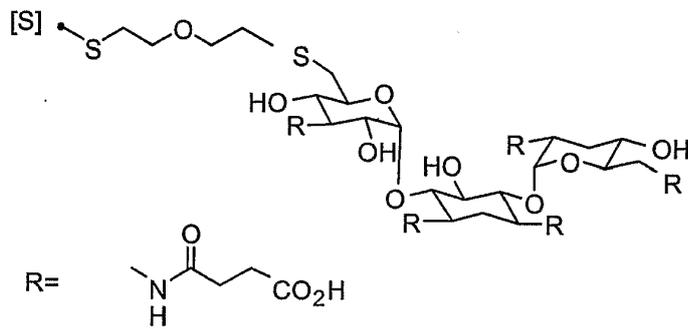


Figura 15b

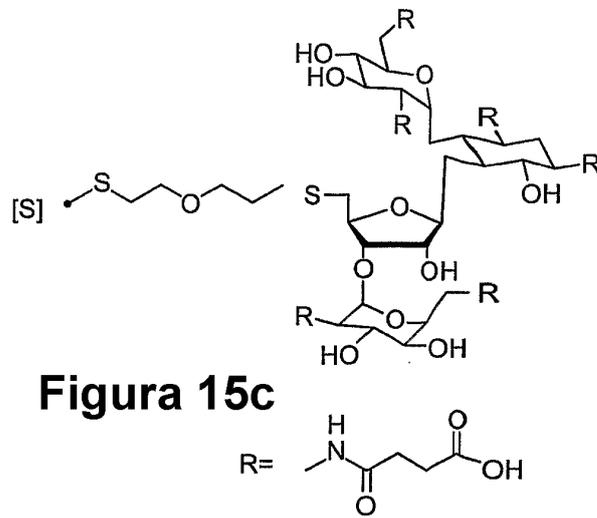


Figura 15c

Figure 15g

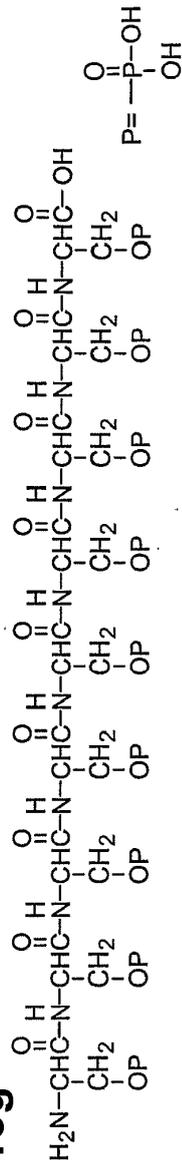


Figure 15h

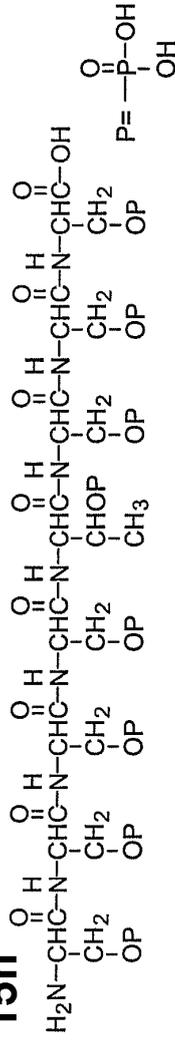
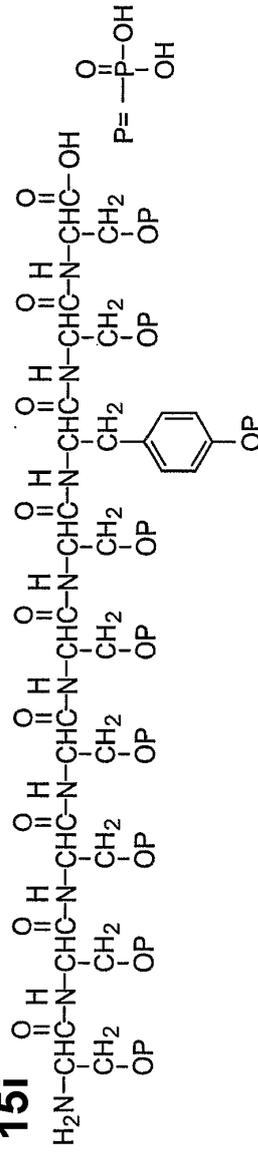


Figure 15i



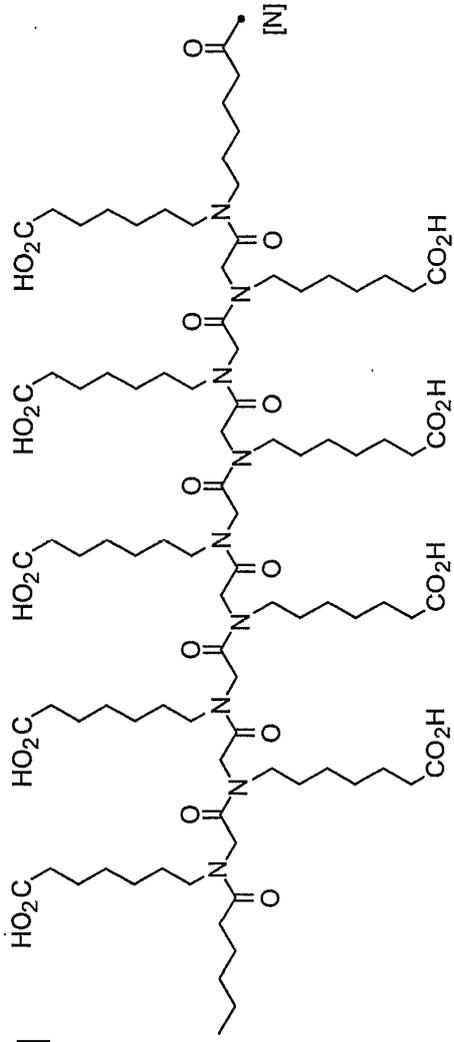


Figura 15l

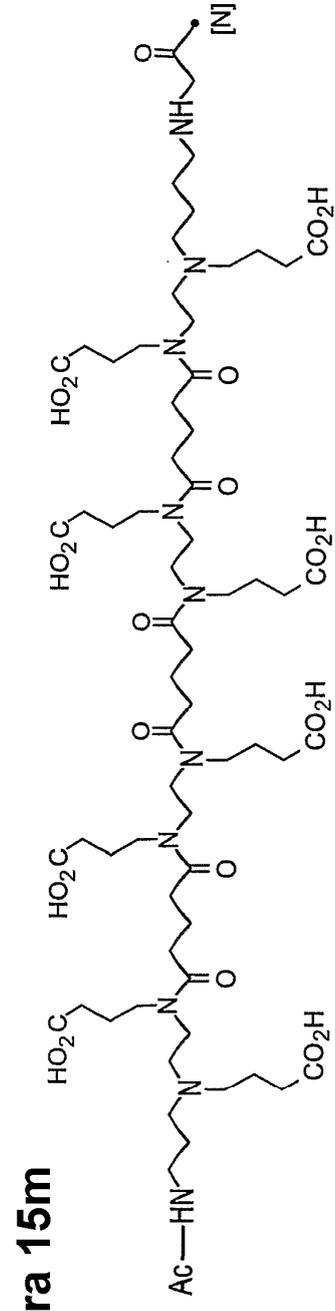
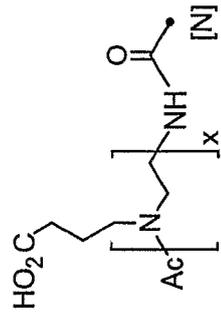
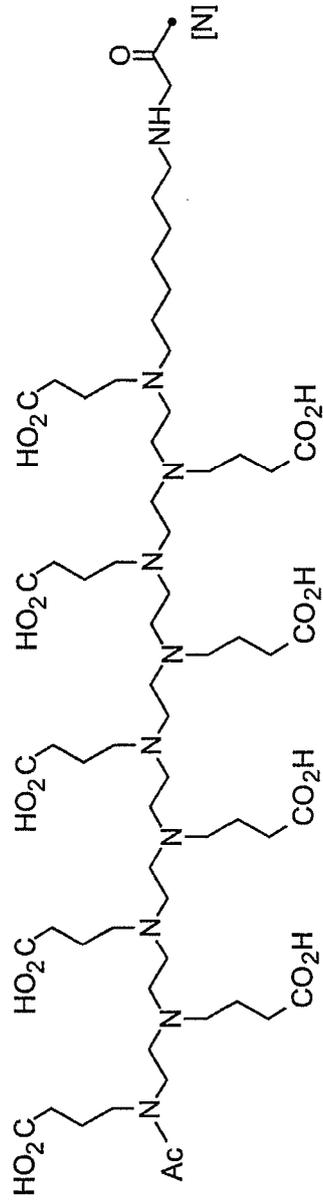


Figura 15m

Figura 15n



X = 2-20

Figura 15p

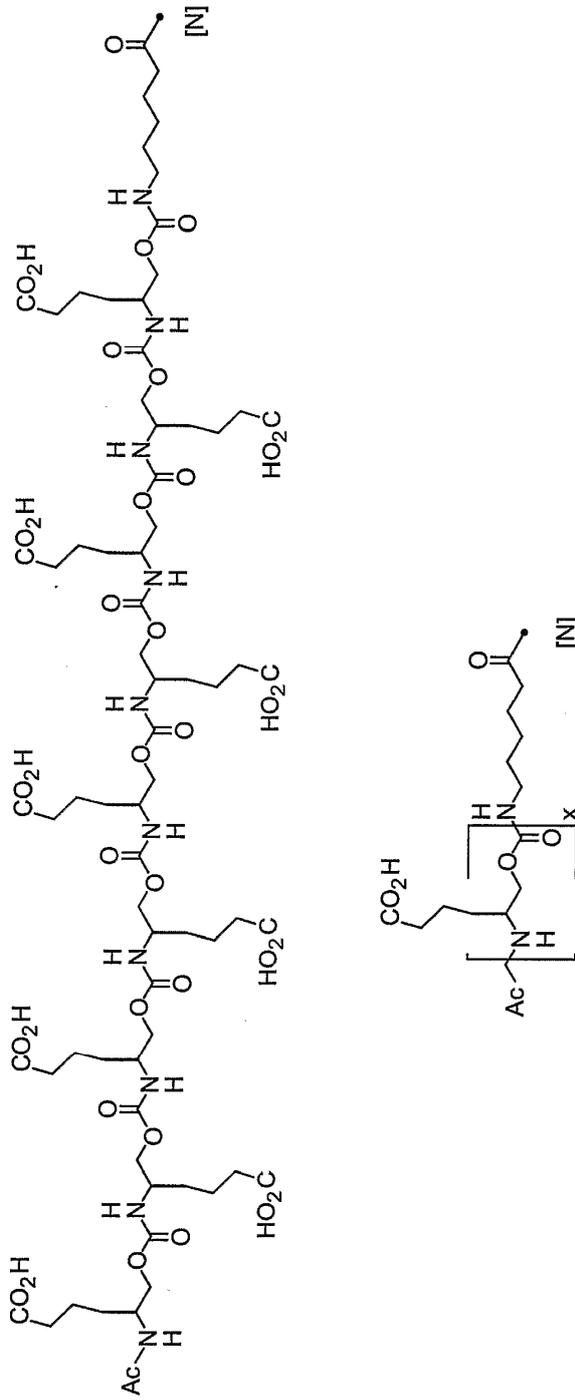
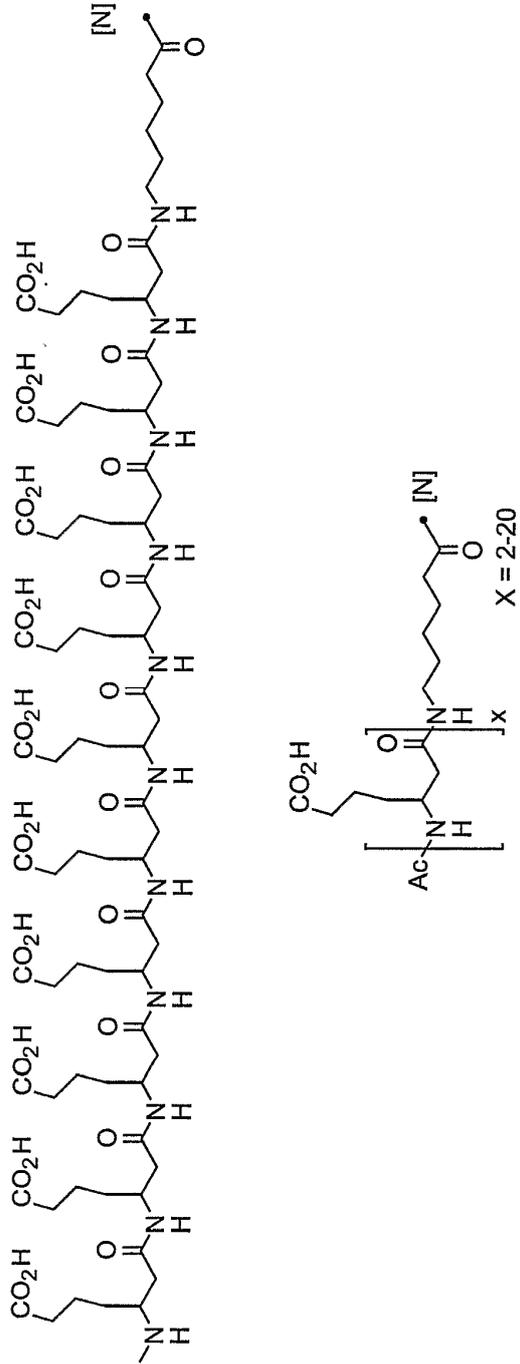


Figura 15q



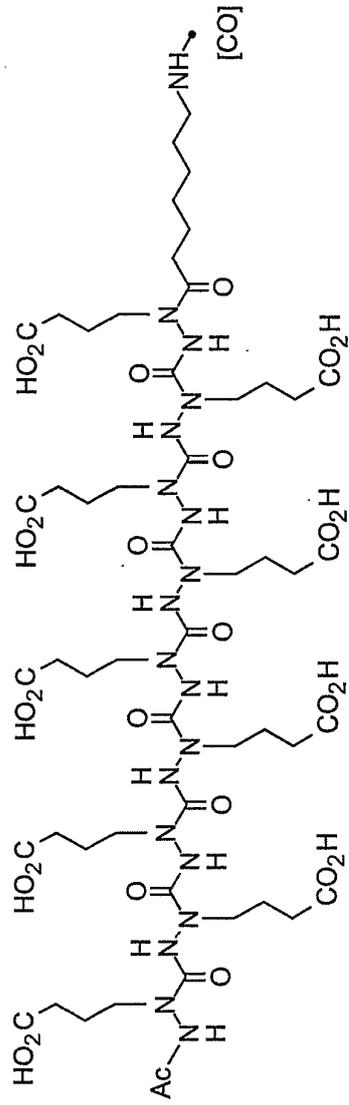


Figure 15r

Figure 15s



Figura 16a

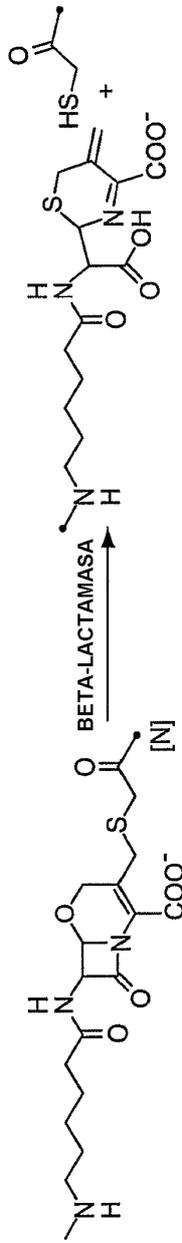


Figura 16b

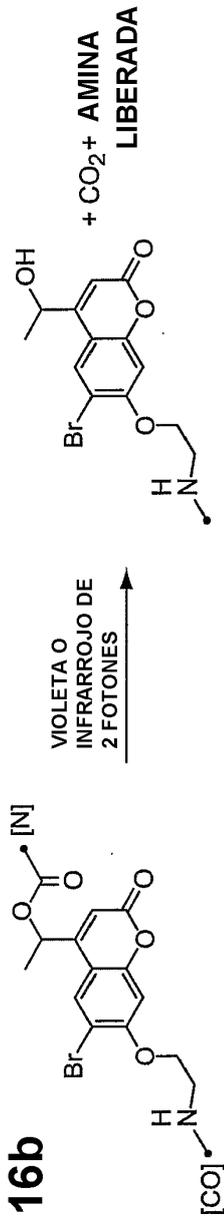
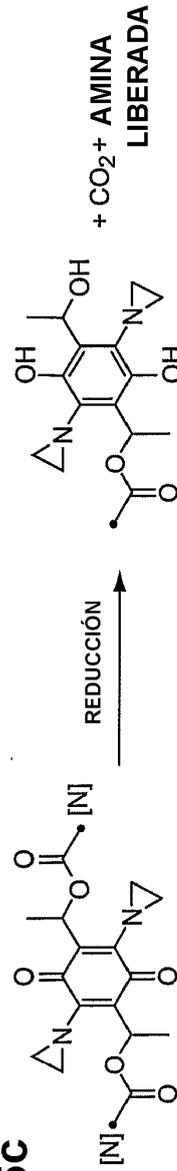


Figura 16c



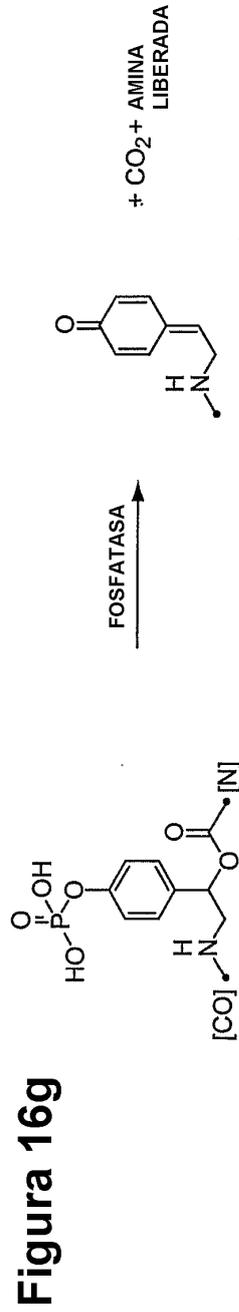
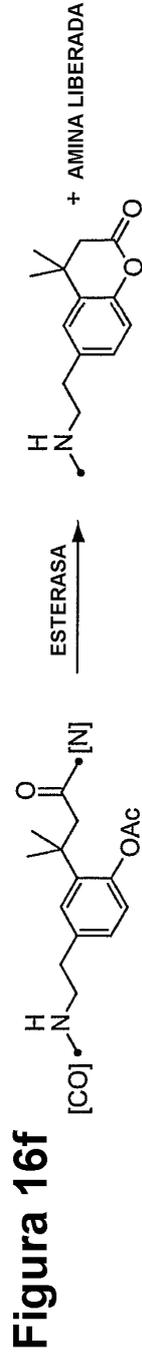
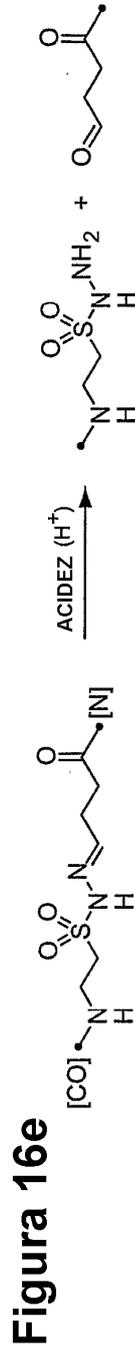
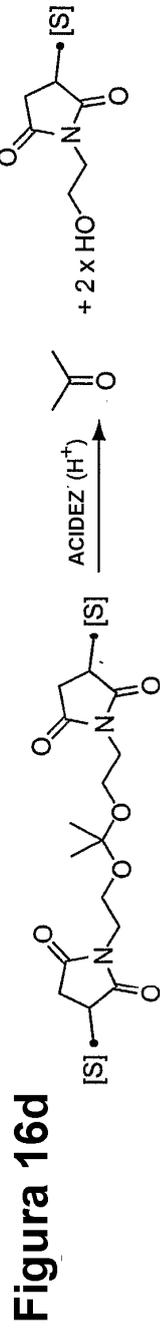


Figura 17a

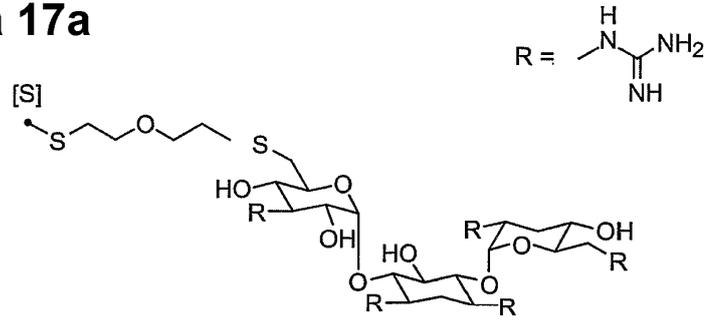


Figura 17b

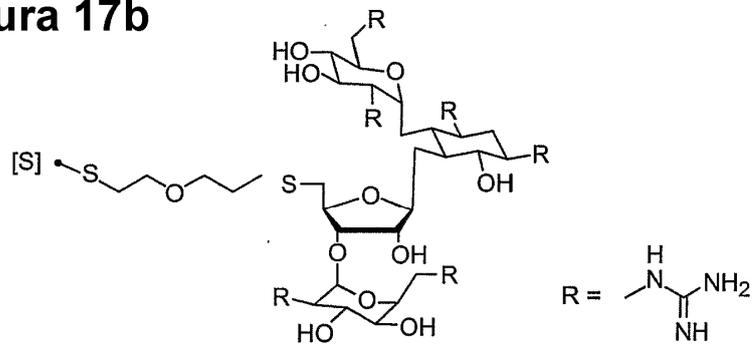


Figura 17c

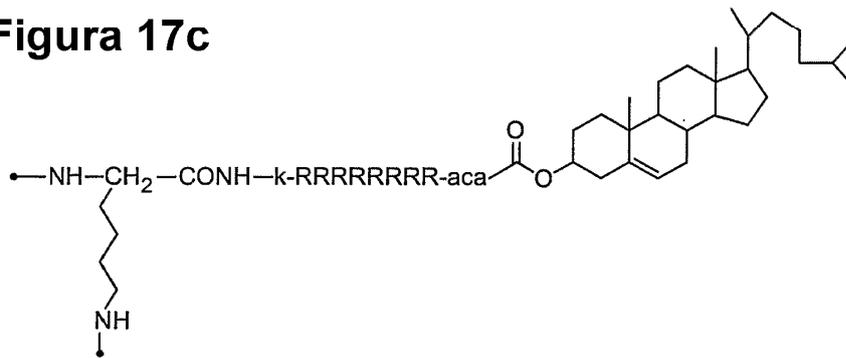


Figura 17h

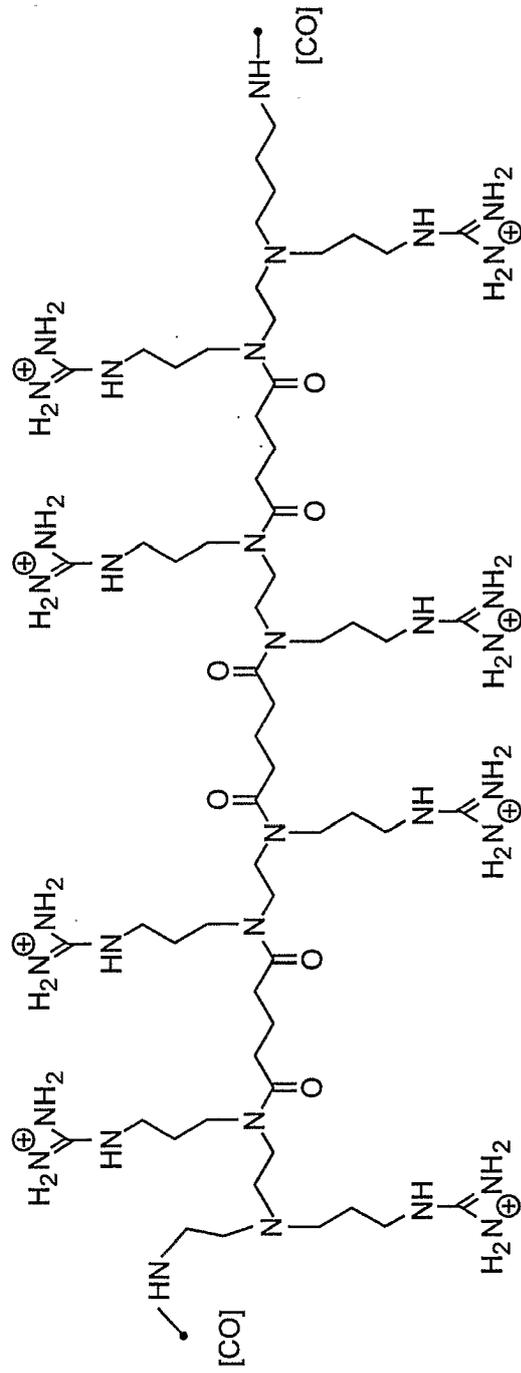


Figura 17i

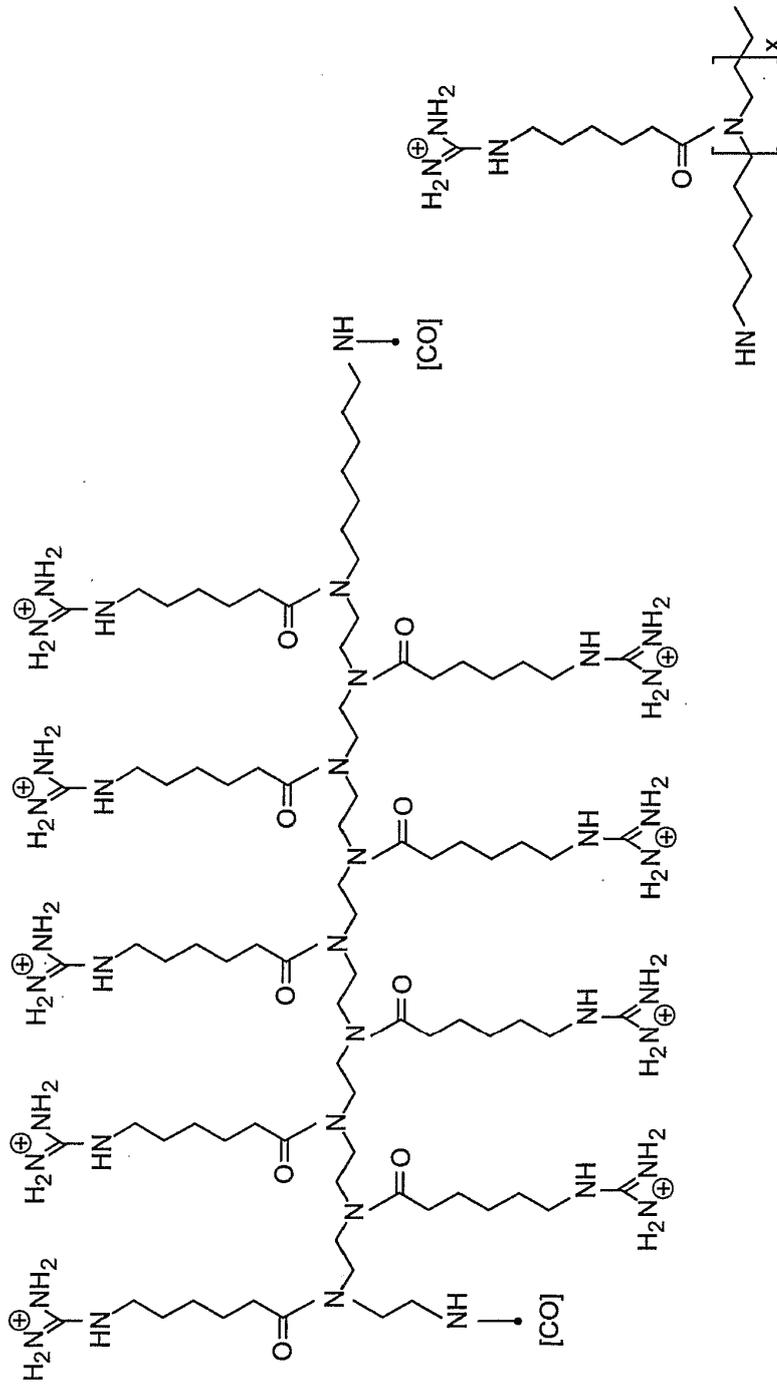


Figura 17j

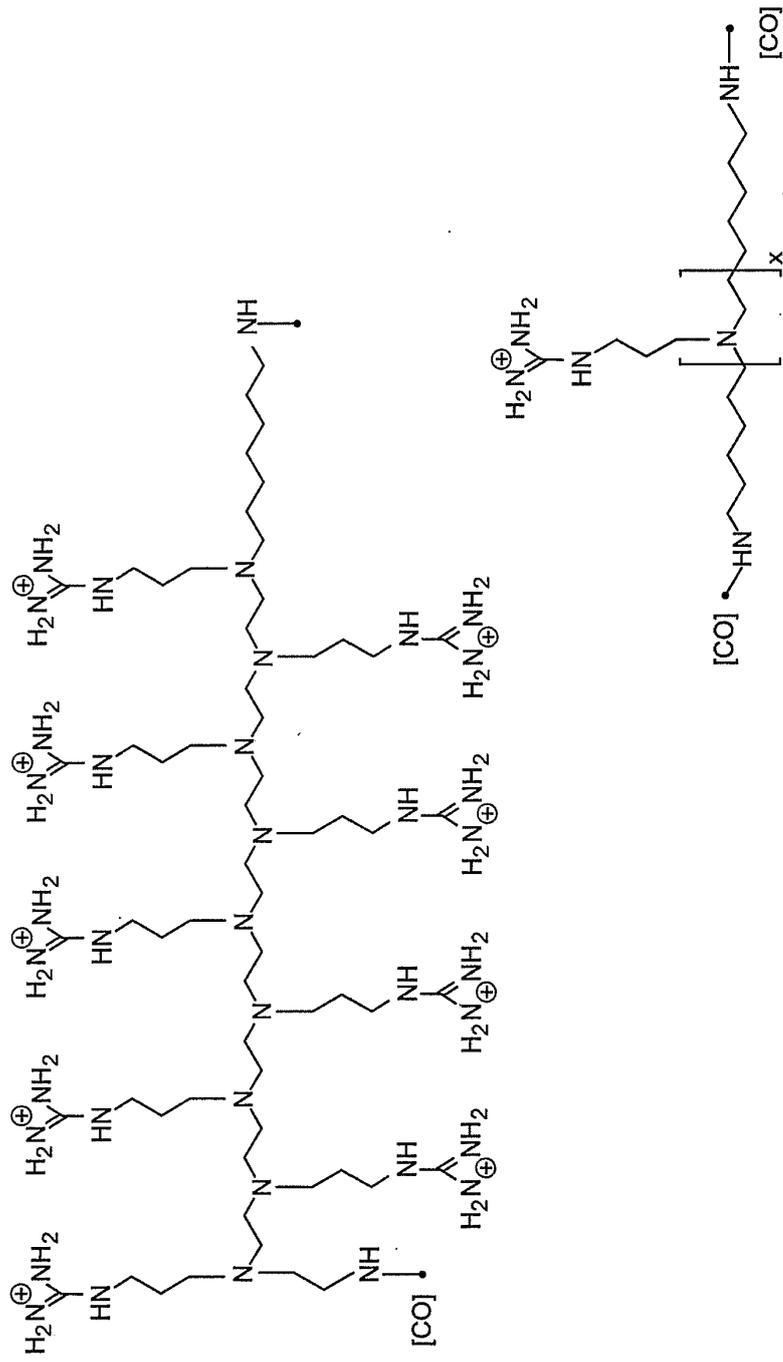


Figura 17k

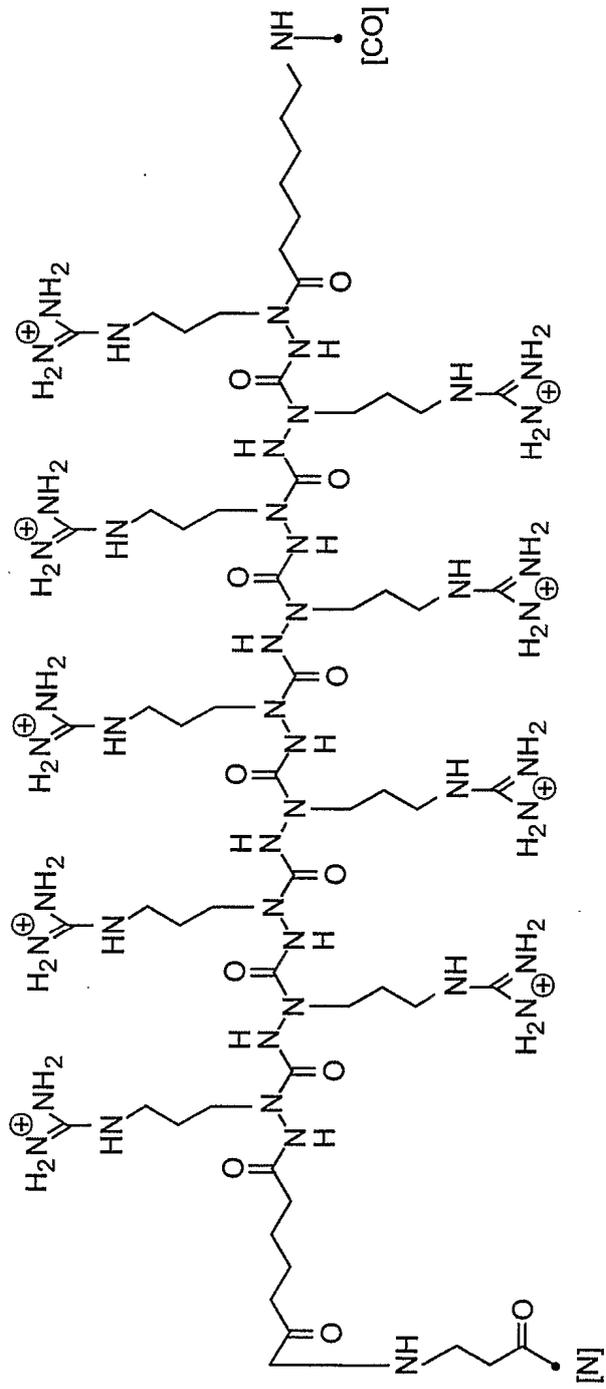


Figura 171

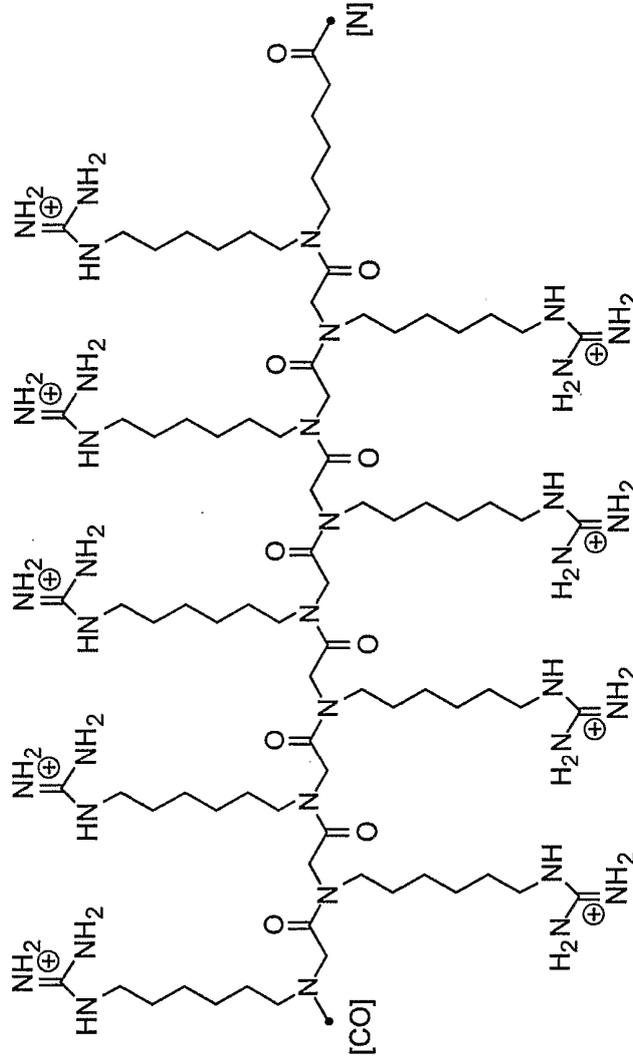


Figura 17m

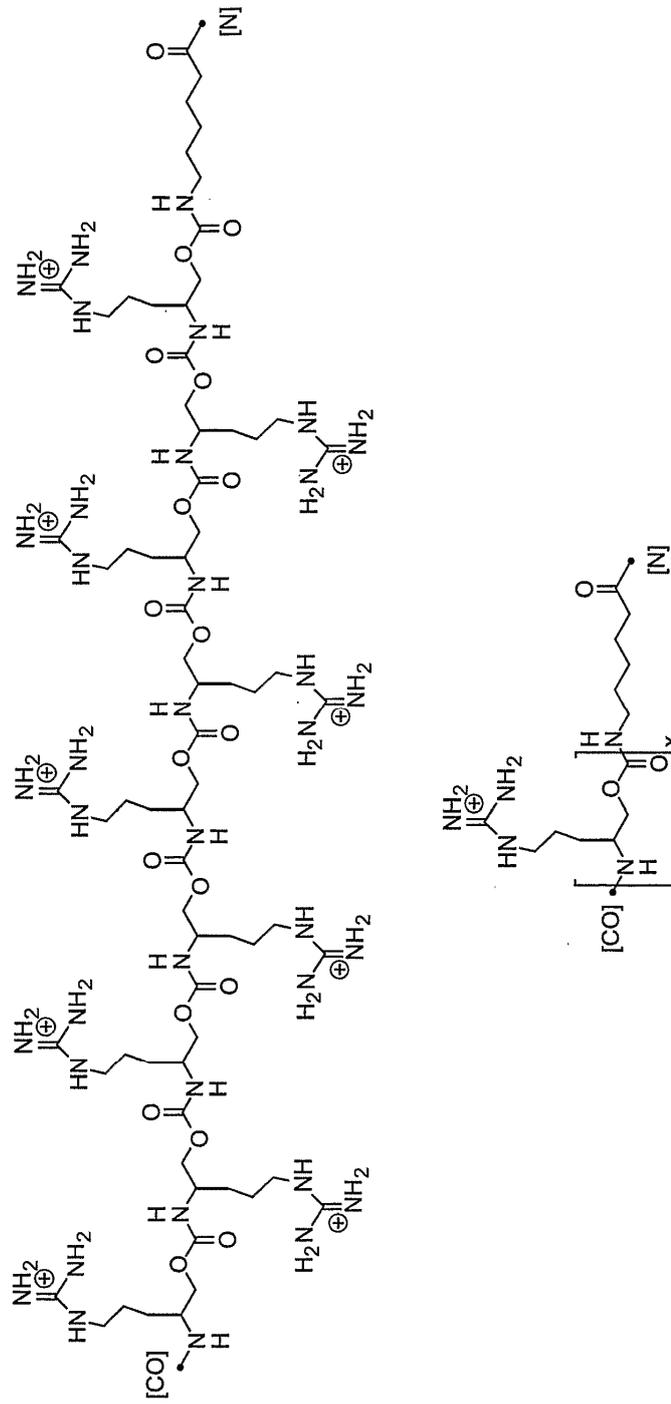


Figure 17n

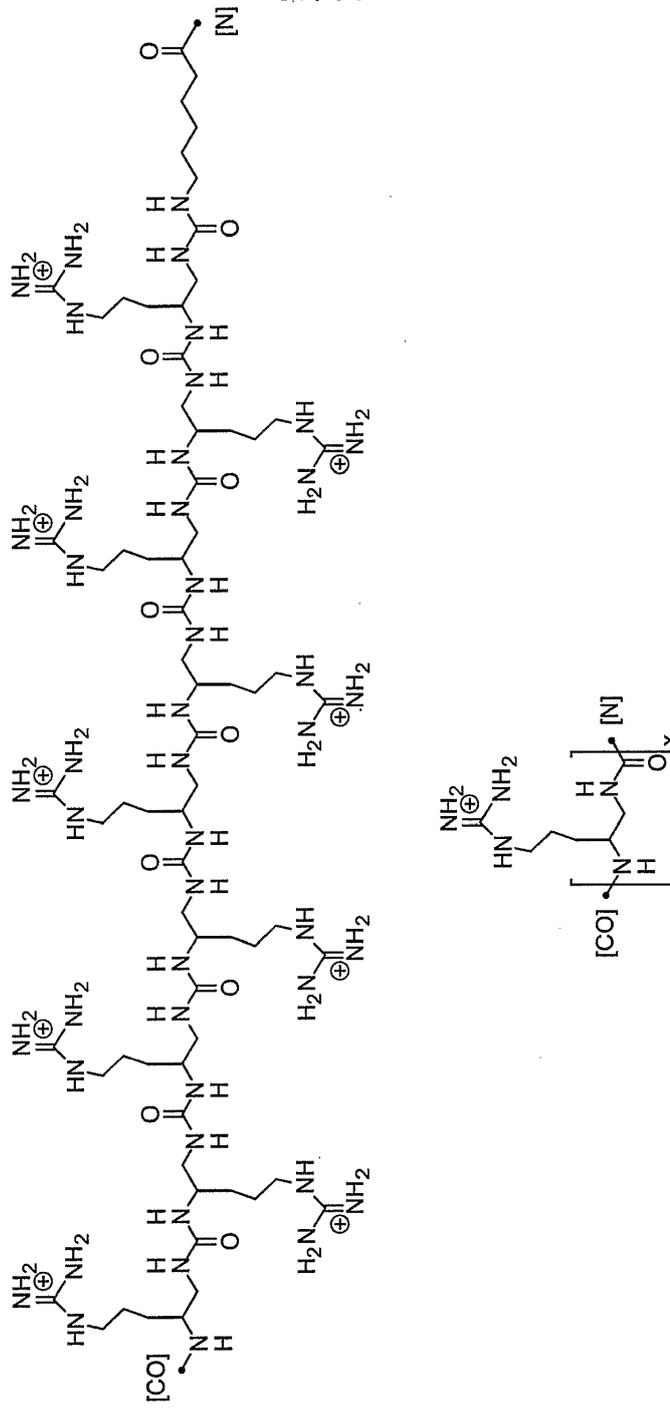
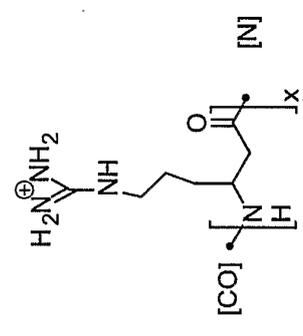
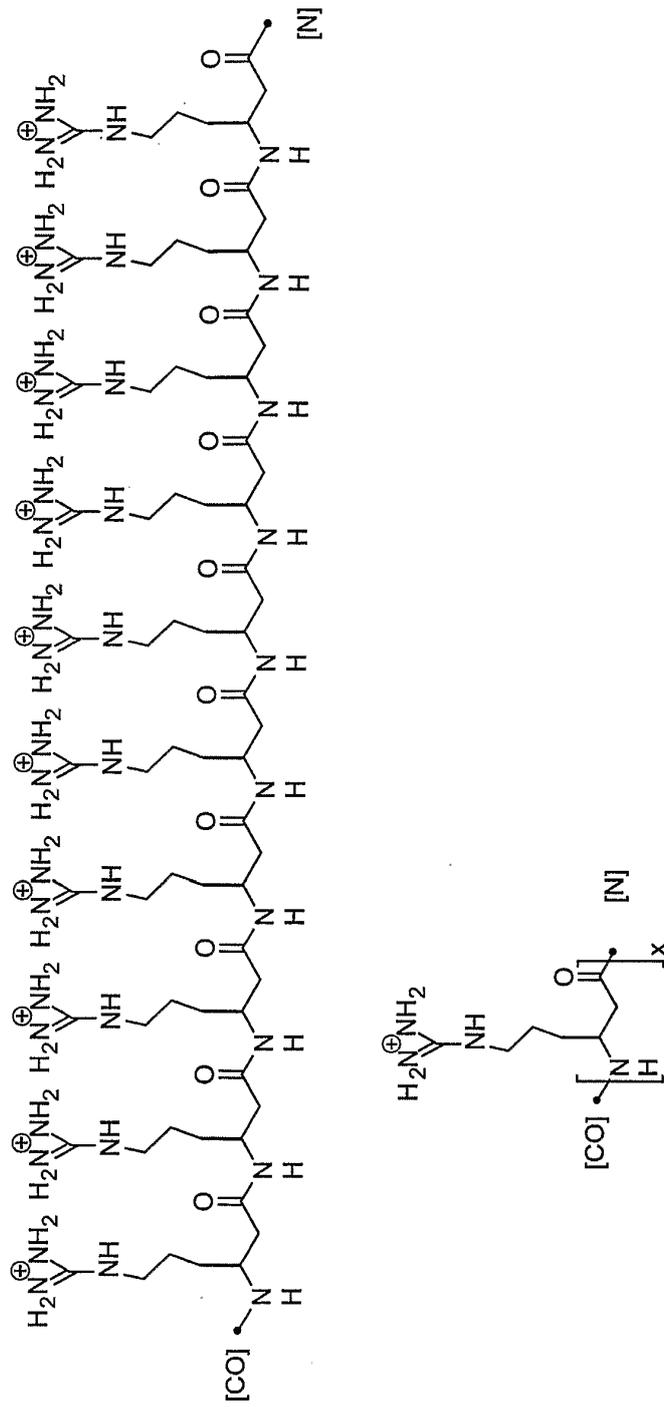


Figura 17o



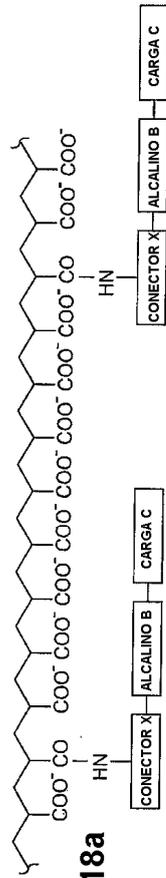


Figura 18a

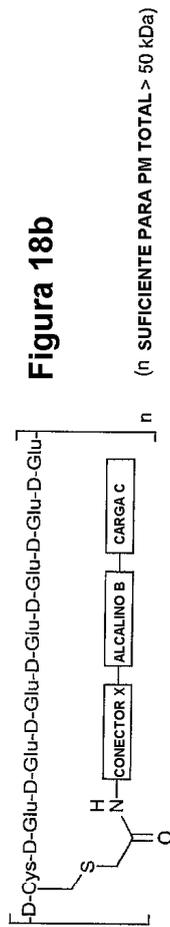


Figura 18b

(n SUFICIENTE PARA PM TOTAL > 50 kDa)

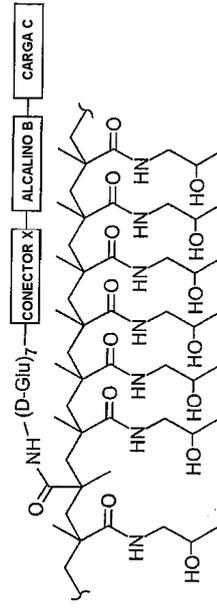


Figura 18c