

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 250**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2012** **PCT/EP2012/052773**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012** **WO12110636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012** **E 12710665 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2675482**

54 Título: **Péptidos transportadores para el suministro celular**

30 Prioridad:

18.02.2011 EP 11155088

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

19.04.2017

73 Titular/es:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y
TECNOLOGIA AGRARIA Y ALIMENTARIA
(100.0%)
Ctra. de A Coruna Km. 7,5
E-28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**ALONSO MARTÍ, M COVADONGA y
MARTÍNEZ ESCRIBANO, JOSÉ ÁNGEL**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 609 250 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 transportadores para el suministro celular

5 Campo de la invención

La invención se refiere al sector tecnológico del suministro de moléculas en células, ya sea en el citoplasma o en el núcleo, o entre células (transporte célula a célula). Este suministro puede ser útil en muchos campos técnicos que comprenden, entre algunos otros: el diagnóstico, la terapia y la farmacología.

10 Estado de la técnica

En los últimos años se han desarrollado muchas estrategias terapéuticas y fármacos nuevos, y su eficacia terapéutica ha evidenciado ser altamente dependiente del sistema de suministro de fármacos utilizado. El desarrollo de transportadores de péptidos que son capaces de llevar un fármaco a su destino intracelular, potenciando su acumulación y aumentando la propagación célula a célula, mejoraría de forma significativa la eficacia y reduciría la toxicidad de cualquier terapia dada.

Existen varias barreras biológicas a nivel celular que debe superar un fármaco dado o una carga útil. Entre ellos, se pueden mencionar la membrana celular y la capa cortical submembranosa de actina. Una vez que los péptidos transportadores han entrado en la célula, el siguiente obstáculo sería escapar a la degradación lisosómica. La endocitosis mediada por receptor es, probablemente, la ruta más común para la captación específica de macromoléculas. El modo exacto de endocitosis es importante, puesto que determina el trayecto del tránsito a través de los diversos compartimentos subcelulares posibles (Zaro). En la mayoría de los casos, el escape endosómico debe producirse antes de la fusión con un lisosoma para prevenir la degradación mediante el pH ácido lisosomal. Después de esto, el escape endosómico es necesario para permitir el acceso del transportador a otros compartimentos subcelulares, el citosol o el núcleo.

La mayoría de los virus y toxinas han desarrollado una maquinaria bien definida para infectar las células y para alcanzar el núcleo celular. De hecho, existe una amplia experiencia en el uso de vectores víricos en terapia génica, pero esta estrategia tiene los efectos secundarios no deseados de introducir muchos otros agentes víricos con una diversidad de funciones en la célula hospedadora, el riesgo de mutagénesis mediada por el virus, la inmunidad preexistente frente al vector vírico o la estimulación de una respuesta inmunitaria frente al propio vector (Moffat) o frente al suero fetal de ternero después de inyecciones repetidas (Bao).

Primera barrera: La membrana extracelular; en el contexto del suministro de fármacos, se han utilizado péptidos para superar la barrera de la membrana celular, los denominados "péptidos de penetración celular" (los CPP, por sus siglas del inglés *cell-penetrating peptides*) para el transporte de diversos cargamentos con pesos moleculares varias veces más grandes que el peso molecular del propio péptido transportador (Futaki). La mayoría de ellos se han diseñado para superar una o dos barreras celulares, pero son ineficaces frente a las otras. El mecanismo exacto de internalización de estos péptidos, que obtienen acceso directo al citoplasma de la célula independientemente del tipo celular, todavía no está claro, pero parece depender de cada tipo de péptido. Se asume que hay más de un mecanismo responsable de la internalización de las diversas moléculas de carga en la célula (Zaro, Ziegler). Se ha propuesto que un CPP de origen vírico (procedente de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana) llamado suministro mediado por el péptido Tat, transcurre a través de macropinocitosis dependiente de energía, con el posterior escape del endosoma al citoplasma y, de forma eventual, su transporte al núcleo a través de los poros nucleares (Wadia). Otros CPP penetran las células a través de interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno, en mecanismos no dependientes de energía, pero su capacidad de difusión intracelular es mucho más limitada (Rothward).

Segunda barrera: membrana endosómica. Después de entrar en la célula mediante algún mecanismo, una segunda etapa sería evitar la degradación lisosómica mediante la endocitosis, también conocido como escape endosómico. Para facilitar el escape endosómico se diseñaron las estrategias descritas anteriormente (Wagner).

Tercera barrera: las enzimas citosólicas. Una vez que el compuesto suministrado está libre en el citosol podría degradarse rápidamente. Los ácidos nucleicos como el ADN y otros compuestos químicos, serían susceptibles en el citoplasma a la degradación mediante endonucleasas, como las ADNasas y muchas otras enzimas proteolíticas, y no serían capaces de alcanzar mediante difusión simple, en un entorno celular deseado en un ambiente celular concurrido.

Cuarta barrera: la membrana nuclear hacia adentro y hacia afuera. Para los fármacos que deben alcanzar el núcleo como el sitio de acción (tales como hormonas, ADN plasmídico, intercaladores de ADN), atravesar la membrana nuclear supone otra barrera para el suministro de fármacos. La captación nuclear de ADN plasmídico es la etapa limitante en la tasade transfección eficaz y la terapia génica satisfactoria. El núcleo está separado del citosol por dos membranas que están interrumpidas por los poros nucleares (Pante). Se ha descrito que determinadas secuencias peptídicas, conocidas como señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas del inglés *nuclear localization*

signals), interaccionan de forma específica con factores citoplasmáticos que pueden, después, transportar las moléculas a través del poro nuclear. Este transporte tiene limitaciones de tamaño, estimado para las moléculas de aproximadamente 40-45 kDa y de menos de 100 nm de diámetro, en promedio. Las NLS son péptidos sin secuencia consenso general, compuestas mayoritariamente de aminoácidos básicos.

Para la terapia génica o la transfección se han descrito varias estrategias para mediar el suministro de enzimas o de ácidos nucleicos al núcleo. Sin embargo, los ácidos nucleicos como el ADN son susceptibles en el citoplasma a la degradación mediante nucleasas como las ADNasas, y la movilidad de fragmentos de ADN más grandes está restringida debido al entorno citosólico hacinado. Además, la entrada del ADN en el núcleo depende en gran medida en la ruptura de la envuelta nuclear que, regularmente, solo se produce durante la mitosis.

Dado que el suministro del ADN al núcleo es uno de los cuellos de botella principales en el suministro no vírico de genes, el acoplamiento de péptidos que contienen una NLS al ADN plasmídico o lineal es la estrategia actual para el suministro, aumentado de estas moléculas de carga al núcleo. Se han probado diversas NLS, entre otros, el péptido procedente del antígeno T grande del SV40 (Branden, Sebestyen), la NLS procedente de Tat del VIH (Sandgren) o la secuencia M9 procedente de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (Subramanina). A pesar del concepto prometedor, existe una falta de consenso con respecto a la potencia de los péptidos NLS en el transporte de ácidos nucleicos. Algunos estudios han demostrado el suministro satisfactorio en el núcleo de oligonucleótidos o de plásmidos linealizados funcionalizados mediante una NSL (Branden), pero la transferencia de plásmidos intactos o de moléculas de ácido nucleico más grandes es menos eficaz debido a las limitaciones de tamaño del poro nuclear (Ciolina). Además, informes recientes sugirieron que algunos tumores presentan defectos genéticos en la maquinaria de exportación nuclear, con una retención de los microARN dentro del núcleo asociada, lo que afecta severamente a la producción eficaz del gen suministrado de interés (Melo).

El direccionamiento de fármacos antineoplásicos hacia tumores plantea dificultades adicionales en el suministro; los fármacos solo penetran en algunas células alrededor de los vasos sanguíneos (Hambley y Hait, Iyer). El problema es particularmente difícil con los tumores sólidos, que están poco perfundidos, y los vasos sanguíneos y el sistema linfático habitualmente son disfuncionales. Los tumores sólidos presentan elevada presión intersticial y la filtración de los vasos tumorales afecta la permeabilidad potenciada y el efecto de retención (Sugahara). La fibrosis intersticial puede además retardar la difusión de compuestos a través del tumor.

Los resultados con nanopartículas dirigidas a las células tumorales también son limitados utilizando las estrategias previas. Las nanopartículas son partículas pequeñas (de unos pocos a 200 nm de diámetro, en promedio), que pueden servir como transportadores de fármacos o de compuestos farmacéuticos, y de agentes de contraste para la formación de imágenes en medicina, que permiten muchas cargas distintas y que aumentan la estabilidad y las propiedades farmacocinéticas de los fármacos a suministrar. Aunque pequeñas en comparación con las células, las nanopartículas son mucho más grandes que la mayoría de las moléculas y tienen menos probabilidad de penetrar las membranas y obtener acceso a las células tumorales que los fármacos, que tienen masa molecular más pequeña, que los péptidos o incluso que los anticuerpos.

Sorprendentemente, la presente invención puede superar todas las barreras y limitaciones enumeradas anteriormente. El único concepto inventivo que subyace en la presente invención y que vincula todas las distintas realizaciones de la invención divulgadas y/o reivindicadas en el presente documento, es el descubrimiento inesperado del uso de péptidos que pueden interactuar con la maquinaria de transporte celular unida a los microtúbulos, para el transporte y suministro de moléculas dentro de las células sin restricción de tamaño. Este transporte y suministro incluye transportar moléculas hacia adentro y hacia afuera del núcleo celular, y también el transporte y suministro célula a célula. Los péptidos imitan los mecanismos fundamentales del transporte celular en su conjunto, sin los efectos no deseados de un vector vírico. Además, las moléculas que transportan los péptidos de la invención mantienen durante el transporte y el proceso de suministro sus propiedades físicas, químicas, biológicas y funcionales.

A los fines de la presente invención, la expresión "péptidos que se unen a proteínas del complejo motor microtubular de la célula", debe interpretarse como péptidos que tienen la capacidad de unirse a las proteínas anteriormente mencionadas. De manera análoga, "péptidos de unión a dineína" debe leerse como péptidos que tienen la capacidad de unirse a dineína.

El transporte dependiente de microtúbulos es muy eficaz en el transporte de proteínas, ácidos nucleicos y orgánulos en la célula normal. La invención se basa en dicho transporte microtubular y comprende péptidos transportadores que reconocen una molécula del sistema motor microtubular y, así, pueden atravesar el citosol con cargas útiles que van desde unos pocos aminoácidos hasta el tamaño de orgánulos, hacia el área perinuclear en el centro organizador de microtúbulos (COMT). El uso de este sistema de transporte con base en el motor molecular celular no tiene precedente en el estado actual de la técnica del transporte/suministro celular. En la naturaleza, solo los virus han desarrollado mecanismos para reconocer alguna proteína del complejo motor microtubular y, mediante este medio, transportarse a través del citoplasma. Además, la característica más inesperada de la presente invención es la posibilidad de manipular este transporte celular para superar no solo el citosol, sino cualquier otra barrera celular existente seleccionada de: membrana nuclear, tránsito hacia adentro y hacia afuera del núcleo, citoplasma y

membrana citoplasmática. Esto permite el tránsito a través de una célula a otra, proyectando las cargas hacia las proyecciones celulares y a través de contactos célula-célula, como los inventores mostrarán a continuación, mediante un movimiento de transporte intra e intercelular rápido más allá de los límites celulares.

En general, los motores moleculares son máquinas moleculares biológicas que son los agentes esenciales del movimiento en los organismos vivos. Hablando en términos generales, un motor puede definirse como un dispositivo que consume energía en una forma y la convierte en movimiento o trabajo mecánico; por ejemplo, muchos motores moleculares basados en proteínas aprovechan la energía química libre liberada mediante la hidrólisis de ATP para realizar trabajo mecánico. Algunos ejemplos de motores moleculares son la actina, la dineína, la kinesina, la miosina, la calmodulina, la dinamina, la ATP sintasa, las helicasas, las polimerasas, las topoisomerasas, la prestina, etc.

Las proteínas motoras son una clase de motores moleculares que tienen la capacidad de moverse a lo largo de la superficie de un sustrato adecuado. Están accionadas por la hidrólisis de ATP y convierten energía química en trabajo mecánico. Algunas de estas proteínas motoras celulares están asociadas con el citoesqueleto y se mueven a lo largo de filamentos de microtúbulos. En la célula normal, las proteínas motoras del citoesqueleto están organizadas en el sistema del complejo motor microtubular.

El sistema del complejo motor microtubular es un gran complejo macromolecular compuesto por distintas proteínas motoras tales como la dineína, la dinactina, p150-Glued y proteínas reguladoras tales como LIS1, NDEL1, NDE1 y NUDC. Las proteínas motoras son la fuerza impulsora responsable de la mayoría del transporte activo de proteínas y vesículas en el citoplasma. Las kinesinas y las dineínas desempeñan papeles esenciales en el transporte intracelular tal como el transporte axónico, y en la formación del huso mitótico y la separación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.

La dineína es una proteína del complejo motor microtubular que está compuesta por cadenas pesadas, intermedias y ligeras. Se han descrito varias familias de cadenas ligeras de la dineína. Existen hasta seis cadenas ligeras que pertenecen a tres familias de proteínas (DYNLL/DLC8, DYNLT/tctex y DYNLRB/LC7/roadblock), dos cadenas intermedias ligeras (DYNC1LI o DLIC) y dos cadenas intermedias (DYNC1I o DIC), a todas las cuales se las ha relacionado con la unión a la carga y tienen la capacidad de transportar un amplio intervalo de cargas. Las cadenas pesadas son proteínas globulares que producen la hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP) para generar la energía necesaria para el movimiento. De hecho, la dineína es la responsable del reposicionamiento del aparato de Golgi después de la mitosis de la célula, lo que da una idea de la capacidad de esta molécula para transportar orgánulos de gran tamaño. En el documento WO2004015083 se divulga que la dineína y la kinesina son proteínas motoras que tienen la capacidad de transportar macromoléculas al núcleo o la región perinuclear de forma intracelular, potenciando de este modo la captación de un fármaco en una localización subcelular diana.

Las kinesinas están implicadas en la reposición de dineína en las puntas de los microtúbulos en la periferia celular llamadas extremos "plus", en donde se acumula. Los extremos "plus" son los extremos de los microtúbulos en crecimiento. Existen otras funciones de la dineína en los extremos "plus" de los microtúbulos tal como la captura cortical de los microtúbulos, el suministro de las señales que regulan el citoesqueleto de actina y la captura de cargamentos vesiculares para el movimiento dependiente de dineína. El motor molecular dineína y las moléculas asociadas (dinactina, p150^{glued}, etc.) son parte de un complejo motor multifuncional implicado en la polarización celular, la proyección de lamelipodios y de filopodios, lo que aumentan los contactos entre células (Dujardin).

Las fracciones del transportador peptídico capaces de unirse a la dineína motora microtubular que son el objeto de la presente invención, permitirían el suministro de moléculas o de estructuras (cargamentos) no solo dentro de la célula, sino también hacia adentro y hacia afuera del núcleo celular, propagándose de este modo rápidamente a las células vecinas. Los péptidos transportadores de la presente invención tienen la capacidad de aprovechar las propiedades del complejo motor microtubular y controlar la permeabilidad del compartimento nuclear por sí mismos, como se demuestra en la presente invención, debido a la propiedad exclusiva de la dineína de desensamblar la envoltura nuclear (Salina) más allá de las limitaciones de tamaño intrínsecas del transporte por el poro nuclear de las NLS. Aunque la dineína se ha utilizado como prueba de concepto para la presente invención, la solución técnica anteriormente mencionada que ofrece la invención, como se divulga en este documento, no se limita a los péptidos que se unen a la dineína sino a cualquier péptido que se une a proteínas del complejo de microtubular de la célula. De hecho, en la **Tabla 1**, además de los péptidos que se unen a la dineína que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 1 a 10 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), y del control comparativo representado por la SEQ ID NO: 12, también se menciona un péptido adicional del motor molecular miosina (TransMy, representado por la SEQ ID NO: 11).

En la presente invención, se demuestra que las inesperadas propiedades dinámicas de los péptidos que comparten como característica técnica, su capacidad de unión a una proteína motora molecular celular natural, uno de los componentes del complejo motor microtubular, preferentemente la dineína celular. La presente invención se centra en el uso de esos péptidos para fines de transporte y/o de suministro accionados por el complejo motor celular. Los péptidos permiten el movimiento rápido de sustancias cargadas dentro de las células, a través del citoplasma, hacia adentro y hacia afuera del núcleo celular y de célula a célula, siendo la primera consecuencia que este transporte

estimula la eficacia de captación celular de las sustancias a suministrar deseadas.

Además, la presente invención demuestra que los péptidos son útiles para suministrar otras sustancias de distinta composición química, de vehículos, ya sea de tamaño pequeño o más grande, o de estructuras complejas tales como las nanopartículas. Los péptidos de suministro celular a la célula habitualmente están acoplados a otras estructuras, como se divulga en el estado de la técnica, tales como dendrímeros, aptámeros, sujetos a hélices macromoleculares, etc.; siendo las más ampliamente utilizadas las micro- o nanopartículas, los nanotransportadores, los polímeros, los armazones o los liposomas, los que potenciarían la estabilidad, la vida media y otras propiedades farmacocinéticas de cualquier fármaco o producto suministrado (Subramanian). En la actualidad, la investigación en nanopartículas terapéuticas se realiza para dirigir el suministro de los fármacos de forma más precisa, para mejorar su solubilidad, para prolongar su vida media, para mejorar la eficacia, para reducir la toxicidad a través de la potenciación de la especificidad y para reducir la inmunogenicidad.

El direccionamiento de nanopartículas es particularmente importante para las aplicaciones en oncología y, hasta la fecha, las estrategias terapéuticas aprovechan la acumulación pasiva en tumores de las nanopartículas manipuladas, debido a la permeabilidad potenciada y al efecto de retención que existe en los tumores (Hamble y Hait). Como se describe anteriormente, esta acumulación es un proceso pasivo, no selectivo, que permite que se acumulen en el tumor macromoléculas de un determinado intervalo de tamaños. Por el contrario, la presente invención muestra que la unión a los péptidos transportadores de los inventores proporciona un transporte activo y selectivo más eficaz, que atraviesa de forma activa los límites celulares accionado por los motores moleculares celulares.

Los ligandos conjugados con la superficie de las nanopartículas manipuladas pueden influir en el modo de internalización en la célula. Como ya se divulgó en el estado de la técnica, se ha demostrado que los ligandos tales como el ácido fólico, la albúmina y el colesterol, para superar la barrera de la membrana celular, facilitan la captación a través de la endocitosis mediada por caveolina, mientras que los ligandos para los glucorreceptores, promueven la endocitosis mediada por clatrina (Bareford). Ninguno de ellos tiene la capacidad dinámica que pueden presentar los péptidos transportadores objeto de la presente invención.

Para poner en evidencia esas propiedades, se han elegido nanopartículas de oro-tiopronina unidas a los péptidos de suministro de la invención, en comparación con las mismas partículas unidas a un péptido de penetración celular que no se une a ningún motor molecular celular como ejemplo comparativo de control. Las nanopartículas de oro de distintos tamaños se han utilizado ampliamente debido a la falta de toxicidad y la fácil eliminación mediante depuración renal (Howard). Las nanopartículas pueden fusionarse a tiopronina u otras moléculas para mejorar la estabilidad de la nanopartícula y prevenir la agregación, como se divulga previamente en el estado de la técnica.

La presente invención incluye aspectos particulares de nanopartículas terapéuticas, críticos para su uso eficaz, en los que las nanopartículas se han funcionalizado con las secuencias peptídicas pequeñas de suministro de la invención, que se unen a uno de los componentes de proteína del complejo motor microtubular, preferentemente el motor molecular dineína. Por medio de este nuevo concepto, la presente invención muestra que las nanopartículas funcionalizadas tienen la capacidad de involucrar al transporte dependiente de microtúbulos y hacerse móviles, accionadas por los motores moleculares celulares. Mediante este transporte celular activo, las nanopartículas que portan cualquier carga útil, adquieren la propiedad de moverse de forma segura en el entorno intracelular por todo el citosol, hacia adentro y hacia afuera del núcleo celular, y de ser suministradas de célula a célula más allá de los límites. Además, cuando los péptidos que se unen al complejo motor microtubular de la invención están unidos a las nanopartículas, la concentración intracelular de las nanopartículas se ve aumentada de forma inesperada, así como sus propiedades dinámicas y su capacidad de ser dirigidas a través de las barreras intra- e intercelulares. Las nanopartículas funcionalizadas, accionadas por los péptidos propulsores de suministro de la presente invención, pueden entrar y salir del núcleo, propagarse a través de las proyecciones celulares y de los contactos entre células, alcanzando células vecinas con elevada eficacia, como los inventores muestran en los ejemplos.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a péptidos que se unen a proteínas del complejo motor microtubular, preferentemente, a péptidos de unión dineína, que comprenden las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), que tienen la capacidad de suministrar moléculas en la célula, ya sea en el citoplasma, en el núcleo o a niveles intercelulares (transporte célula a célula). Por lo tanto, dichos péptidos pueden utilizarse en muchos campos técnicos que comprenden, entre algunos otros: el diagnóstico, la terapia y la farmacología. Dichos péptidos, algunos de origen vírico, pueden imitar los mecanismos víricos fundamentales de entrada y transporte celulares en su conjunto, sin los efectos no deseados de los vectores víricos mencionados anteriormente. Estas secuencias se han identificado definiendo el dominio de proteína mínimo que interactúa con la maquinaria de transporte celular unida a los microtúbulos. Por lo tanto, la presente invención muestra de forma sorprendente las propiedades dinámicas de los péptidos como péptidos transportadores para el suministro, accionados por el complejo motor molecular intracelular. Los péptidos de la invención permiten el movimiento rápido de las sustancias

cargadas, ya sea dentro de la célula, a través del citoplasma, hacia adentro y hacia afuera del núcleo celular y de célula a célula, siendo la primera consecuencia de su uso como transportadores el estímulo de la eficacia de captación celular de las sustancias deseadas (por ejemplo, fármacos o productos farmacéuticos) a suministrar.

- 5 Los péptidos de la invención son útiles para suministrar sustancias, tales como las nanopartículas. Por lo tanto, la presente invención incluye aspectos particulares de nanopartículas terapéuticas, críticos para el uso eficaz, en los que las nanopartículas se han funcionalizado con las secuencias peptídicas pequeñas de suministro de la invención, tomadas a partir de una proteína de origen vírico o celular, que se unen a la proteína del complejo motor microtubular dineína. Por medio de este concepto nuevo, la presente invención demuestra que las nanopartículas
- 10 funcionalizadas tienen la capacidad de involucrar al transporte dependiente de microtúbulos y de hacerse móviles, accionadas por los motores moleculares celulares. Mediante este transporte celular activo, las nanopartículas que portan alguna carga útil adquieren la propiedad de moverse de forma segura en el entorno intracelular a través del citosol, hacia adentro y hacia afuera del núcleo celular y se suministran, a través de los límites, de célula a célula. Además, como se describe anteriormente para el péptido propulsor unido a otros péptidos o compuestos químicos,
- 15 cuando está unido a nanopartículas, la concentración intracelular de las nanopartículas se ve aumentada de forma inesperada, así como sus propiedades dinámicas y su capacidad de ser dirigidas a través de las barreras intra- e intercelulares. Las nanopartículas funcionalizadas accionadas por este péptido propulsor de suministro, incluido en la presente invención, pueden entrar y salir del núcleo, propagarse a través de las proyecciones celulares y de los contactos entre células, alcanzando células vecinas con elevada eficacia.

20 Las realizaciones preferentes de la invención se detallan en las reivindicaciones.

- Una de esas realizaciones son péptidos que se unen a proteínas que son componentes del complejo motor microtubular, preferentemente péptidos de unión a dineína, para su uso en el transporte y/o el suministro de
- 25 sustancias a cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido que comprende el citoplasma, el núcleo, el nucleolo, mejorando la capacidad de la sustancia transportada/suministrada de acumularse en la célula; atravesando cualquier barrera celular y comprendiendo la difusión célula a célula. Son particularmente preferentes los péptidos de unión a proteína que comprendan al menos una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), que tengan
- 30 preferentemente la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), más preferentemente que comprendan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, y aún más preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6.

- 35 Los péptidos de unión al complejo motor microtubular de la invención son particularmente adecuados para su uso en el transporte y/o el suministro de sustancias orgánicas, preferentemente seleccionadas entre: derivados hormonales, factores de crecimiento, péptidos, proteínas, polímeros, polisacáridos, enzimas, lípidos, ácidos nucleicos, fármacos o productos farmacéuticos; o de sustancias orgánicas preferentemente seleccionadas entre: metales, oro, óxido de hierro o compuestos magnéticos. A modo de ejemplo, las sustancias preferentes a transportar/suministrar mediante
- 40 los péptidos de la invención se seleccionan entre: flagelina de *Salmonella*; fármacos antiinflamatorios; fármacos analgésicos; interferones; citoquinas; anticuerpos; antígenos, preferentemente, TERT^h, M2 del virus de la gripe o ACE; agentes antitumorales o quimioterapéuticos, preferentemente, leucovorina, doxorubicina o péptidos inhibidores de TERT^h; agentes terapéuticos o indicadores de diagnóstico.

- 45 Otra realización preferente de la invención son péptidos de unión al complejo motor microtubular, tales como los péptidos de unión a dineína, unidos a una estructura seleccionada entre: nanopartículas, dendrímeros, virus, liposomas, micelas, armazones, redes, superficies o matrices, más preferentemente, una nanopartícula funcionalizada y, más preferentemente, una nanopartícula funcionalizada unida a un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente unida a un péptido de unión a dineína, en el que dicho péptido de unión a
- 50 proteína comprende al menos una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), más preferentemente que comprendan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y aún, más preferentemente, que tengan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6.

- 55 En una realización adicional de la invención, las estructuras funcionalizadas mencionadas anteriormente, en particular las nanopartículas funcionalizadas, comprenden adicionalmente al menos un adyuvante seleccionado entre: polímeros, preferentemente PEG, protamina o avidina.

- 60 Otra realización preferente de la presente invención son composiciones, en particular composiciones farmacéuticas, que comprenden un péptido de unión al complejo motor microtubular, tal como un péptido de unión a dineína, o una estructura funcionalizada, preferentemente una nanopartícula funcionalizada, unida a un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente a un péptido de unión a dineína, acoplada a una sustancia a suministrar a cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende el citoplasma,
- 65 el núcleo, el nucleolo, mejorando la capacidad de la sustancia transportada/suministrada de acumularse en la célula; atravesando cualquier barrera celular y comprendiendo la difusión célula a célula. Las composiciones más

preferentes, de acuerdo con la presente invención, comprenden un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente un péptido de unión a dineína, en las que dichos péptidos de unión a la proteína comprenden al menos una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), que tengan preferentemente la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), más preferentemente que comprendan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y aún más preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6.

Las composiciones preferentes de acuerdo con la presente invención también pueden comprender una estructura funcionalizada unida a un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente a un péptido de unión a dineína, en las que dicho péptido de unión a la proteína comprende al menos una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), más preferentemente que comprendan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y aún más preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6.

Entre las composiciones farmacéuticas de la invención, son preferentes las composiciones de vacunas que comprenden un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente a un péptido de unión a dineína, o una estructura funcionalizada unida a un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente a un péptido de unión a dineína, en las que dichos péptidos de unión a la proteína comprenden al menos una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), más preferentemente que comprenda la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y aún más preferentemente que tenga la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, estando adicionalmente el péptido mencionado anteriormente acoplado a un antígeno a suministrar en cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido que comprende el citoplasma, el núcleo, el nucleolo, mejorando la capacidad del antígeno transportado/suministrado de acumularse en la célula; atravesando cualquier barrera celular y comprendiendo la difusión célula a célula.

Además, otras composiciones farmacéuticas preferentes de acuerdo con la presente invención son las composiciones antivirales, que comprenden una estructura funcionalizada, preferentemente una nanopartícula funcionalizada, unida a un péptido de unión al complejo motor microtubular, preferentemente a un péptido de unión a dineína, en las que dichos péptidos de unión a proteína comprendan al menos una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), más preferentemente que comprendan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y aún más preferentemente que tengan la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6; siendo dicha composición antiviral capaz de suministrarse en cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido que comprende el citoplasma, el núcleo, el nucleolo, mejorando la capacidad de la estructura funcionalizada de acumularse en la célula; atravesando cualquier barrera celular y comprendiendo la difusión célula a célula.

Para los fines de la presente invención el término “comprende” o “que comprende” desde el principio de la presente descripción de patente, incluye, de forma específica, el término “que consiste” o “que consiste en”, cuando se hace referencia, en particular, a secuencias biológicas. Quiere decir que los péptidos de la invención pueden “comprender” cualquiera de las secuencias enumeradas en la **Tabla 1** junto con otras secuencias o moléculas o, en una realización preferente, los péptidos de la invención pueden “consistir en” cualquiera de dichas secuencias enumeradas en la **Tabla 1**, significando el último caso que los péptidos de la invención están restringidos de forma precisa al fragmento identificado como tal por la SEQ ID NO.

Descripción detallada de la invención

Las secuencias de los péptidos, de acuerdo con la presente invención, que se unen al motor molecular celular dineína, de origen vírico y celular, impulsando así el movimiento intracelular unido al complejo motor microtubular, se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1

SEQ ID NO	SECUENCIA	NOMBRE
SEQ ID NO: 1	TASQT	Péptido 1
SEQ ID NO: 2 Citada como ejemplo de referencia	KSTQT	Péptido 2
SEQ ID NO: 3	KNTMT	Péptido 3
SEQ ID NO: 4	TTQNTASQT	Péptido 4
SEQ ID NO: 5	TVTTQNTASQT	Péptido 5
SEQ ID NO: 6	HPAEPGSTVTTQNTASQTMS	DynPro
SEQ ID NO: 7	MSLLTEVETPIRNEWGSRNNGSSDP HPAEPGSTVTTQNTASQTMS	DynProM2
SEQ ID NO: 8	YTTQNTASQTMS	TransShort
SEQ ID NO: 9	HPTEPYTTVTTQNTASQTMS	TransBA
SEQ ID NO: 10 Citada como ejemplo de referencia	FPNPSGRSSEDKSTQTAG	TransRB
SEQ ID NO: 11	PKDDKNTMTD	TransMy
SEQ ID NO: 12	SLVSSDESVLHGSHESGEHV	<i>Péptido de control</i> INTCT3

Todos los péptidos divulgados en la **Tabla 1**, excepto la SEQ ID NO: 12 (INTCT3) que es el control comparativo, son péptidos de unión al complejo motor microtubular. INTCT3 es una secuencia de aminoácidos aleatoria fusionada a una cola de 8 argininas, el cual es un péptido de penetración celular (CPP) que no se une a ningún motor molecular celular. Todos los péptidos mencionados se ensayaron en la presente invención con el fin de ilustrar y mostrar que cualquier péptido de unión al complejo motor microtubular, y no solo los péptidos comprendidos en la **Tabla 1**, puede utilizarse de forma satisfactoria para transportar y/o suministrar sustancias a cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende la difusión de célula a célula y el suministro de la sustancia. Por lo tanto, la presente invención incluye para dicho fin el uso de cualquier péptido que se una al complejo motor microtubular y/o cualquier péptido de unión a dineína, e incluye los péptidos comprendidos en la **Tabla 1**.

Los péptidos de unión al complejo motor microtubular ensayados en la presente invención se sintetizaron preferentemente con una pureza del 95 %. Pueden comprender de forma opcional ya sea una cola de glicinas (G) en el extremo N-terminal o una cola de argininas (R) en el extremo C-terminal. En una realización preferente de la invención, la cola de glicinas (G) también puede comprender un resto lisina (K) unido a TAMRA (tetrametilrodamina). En otra realización preferente de la invención, los péptidos no comprenden la cola de glicinas (G) en el extremo N-terminal, pero pueden estar unidos a rodamina B.

Estos péptidos transportadores propulsados por el motor molecular fueron capaces de transportar con elevada eficacia cualquier molécula o fármaco unido a ellos, como demostrarán los inventores en el presente documento.

La proteína rodamina B se unió al péptido de suministro como una carga útil y se añadió a células Vero. Su movimiento se registró mediante videomicroscopía a intervalos regulares y se comparó con el de la rodamina unida a los péptidos control que carecen de la secuencia peptídica de unión a dineína (control interno INTCT3). La captación celular de rodamina B fue muy eficaz y esta proteína fluorescente se acumuló rápidamente en el citoplasma de las células tratadas cuando estaba unida a un péptido de unión a dineína, tal como DynPro (significa **Propulsado** por Dineína; **Fig. 1A**, a,c). DynPro se tomó solo como un ejemplo, si bien otros péptidos que se unen a dineína representados en la **Tabla 1**, presentaron propiedades similares, como TransRB (SEQ ID NO: 10 citado como ejemplo de referencia) o TransBA (SEQ ID NO: 9) (**Fig. 1Ae,f**). La fluorescencia de la rodamina B o de TAMRA se encontró distribuida y acumulada cerca del núcleo, en la zona del centro organizador de microtúbulos (COMT). Los péptidos se observaron como puntos fluorescentes rojos que se movían rápidamente, que seguían el movimiento de la dineína a lo largo de los microtúbulos (**Fig. 1A**, a,c). Por el contrario, en las células tratadas con el péptido INTCT3, que no se une a la dineína, unido a rodamina B o TAMRA, se encontró en la membrana celular o escasamente disperso en el citoplasma y la señal fue más baja tras 18 horas después de la adición, incluso aumentando 3 veces la dosis del péptido control añadido al cultivo (debido a la ausencia de retención celular de la proteína fusionada al péptido comparativo o control, que no se une a dineína) (**Fig. 1Ab,d**), que la señal observada utilizando DynPro. La rodamina B/TAMRA unida a los péptidos de unión a dineína se observó dentro de las células desde los primeros minutos después de añadir el péptido a los cultivos, y se acumuló con el tiempo, como se comprueba mediante la señal fluorescente creciente dentro de las células (**Fig. 1B**). Los péptidos que representan las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplo de referencia), mostraron todos una distribución intracelular y propiedades dinámicas similares.

La videomicroscopía a intervalos regulares desveló un movimiento con elevada velocidad de la rodamina B unida al

péptido transportador. Su movimiento intracelular permitió un transporte rápido de la molécula desde la periferia de la célula hacia la zona perinuclear en el COMT (**Fig. 1A, a,c**). Además, fue posible observar el movimiento bidireccional hacia las proyecciones de la célula y el transporte intercelular a lo largo de los contactos entre células (**Fig. 1C b-d** punta de flecha). Este movimiento elevadamente eficaz, la propagación y la transmisión intercelular no se habían descrito nunca antes en el estado de la técnica. Los mismos experimentos se realizaron utilizando tetrametilrodamina (TAMRA) en lugar de rodamina B, obteniendo resultados idénticos. Se probaron diversas formulaciones de los péptidos de la **Tabla 1** obteniendo resultados similares. Sin embargo, DynPro fue preferente debido a sus propiedades de solubilidad y uso fácil.

Se probaron distintas líneas celulares procedentes de diversas especies: ser humano, mono, canina, hámster, insectos, etc., y de distintos orígenes tisulares, a modo de ejemplo: fibroblástico, epitelial, neuronas, macrófagos, linfocitos y también líneas celulares transformadas o tumorales, como las de carcinoma de cuello uterino o neuroblastoma. Los péptidos de unión a dineína presentaron las mismas propiedades en todos los tipos celulares, independientemente de la especie, origen tisular y/o estado de la célula transformada o tumoral (**Fig. 1 C a-d**).

Para enfatizar cómo las propiedades dinámicas de los péptidos dependen del movimiento dependiente de microtúbulos, los inventores analizaron los microtúbulos en las células tratadas con el péptido, con distintos métodos, para demostrar la colocalización con estas estructuras. En las células transfectadas con alfa-tubulina-GFP y/o teñidas para microtúbulos con anticuerpos marcados, los péptidos transportadores/de suministro de la presente invención mostraron colocalización con los microtúbulos. La rodamina unida al péptido transportador se movió utilizando el transporte dependiente de microtúbulos hacia el núcleo, y se agrupó en el centro organizador de microtúbulos o COMT (**Fig. 2**). La dineína propicia la polarización celular hacia la periferia, y se encontró una intensa acumulación de los péptidos transportadores de la invención en las extensiones de la célula; ya sea en las extensiones laminares llamadas lamelipodios y/o las proyecciones finas llamadas filopodios, y pasando a través de las conexiones entre células, comprobando por lo tanto que los péptidos de la invención viajaron entre las células (**Fig. 2**). La proteína rodamina B unida al péptido de suministro se transportó de forma activa a través de las uniones y conexiones célula-célula tales como las uniones adherentes entre células (a modo de ejemplo en las células epiteliales), los filopodios y otros procesos y extensiones, tales como nanotubos, uropodios, podosomas, etc. Este bombeo hacia fuera de la proteína dio como resultado la propagación de forma rápida entre las células por todo el cultivo celular.

Los péptidos de la invención colocalizaron con los microtúbulos, con los anticuerpos anti-cadena ligera de la dineína (anticuerpo anti-DLC8 generado en conejos) y corrieron en paralelo con otras cadenas del complejo motor microtubular, como la cadena intermedia, como se demostró utilizando anticuerpos específicos anti-cadena intermedia (**Fig. 2e**). Se analizó la localización intracelular de la rodamina y se encontró un elevado porcentaje de colocalización con un marcador de lectina (aglutinina de germen de trigo; AGT), que se distribuye de forma amplia en las membranas y los endosomas. Además, este marcador tiñó las uniones y conexiones célula-célula, en donde se encontraron los péptidos colocalizando con la AGT, a medida que viajaban de célula a célula (**Fig. 2f**).

La prueba de este transporte célula a célula de la proteína suministrada por los péptidos transportadores de la invención, muestra la capacidad de propagar cualquier proteína de interés a un elevado número de células. Dado que esta propagación se mantiene intracelular, aumenta la retención celular del compuesto suministrado y evita las pérdidas o filtraciones de la proteína, lo que podría a su vez permitir la reducción de la dosis inicial de cualquier proteína candidata a ser transportada. Esta propiedad de los péptidos transportadores/de suministro de la invención la haría especialmente favorable su distribución en compartimentos aislados o escasamente vascularizados. Además, reduce la exposición del compuesto al entorno extracelular, lo que podría beneficiar la biodistribución de un determinado compuesto a transportar y eventualmente, colaborar en el "ocultamiento" del compuesto, para reducir su reconocimiento por parte del sistema inmunitario y su potencial inmunogénico contra el propio transportador.

En paralelo, se ensayó en cada experimento un péptido de control que no se une a motor (INTCT3), que mostró una señal más baja incluso aumentando 3 veces su concentración inicial. Este se mantuvo en la periferia celular y apenas se observó señal del péptido dentro de las células, careciendo del movimiento rápido registrado con el péptido de unión a dineína (DynPro). Además, INTCT3 carecía de la propiedad de acumularse y/o del tráfico de célula a célula (**Fig. 1Ac, d**).

Se demostró que el transporte de péptidos de suministro es dependiente de los microtúbulos, como corresponde al movimiento dependiente de la dineína motora microtubular. La presente invención muestra cómo el transporte puede detenerse con fármacos despolimerizantes de microtúbulos, como el nocodazol, y que tras el lavado del fármaco el transporte se recuperó (**Fig. 3**). No obstante, otros agentes farmacológicos despolimerizantes del citoesqueleto de actina (latrunculina A o jasplakinolida) no inhibieron este movimiento debido a que el transporte dependiente de dineína no es dependiente de actina.

Otro interés particular del transporte unido a los péptidos de unión a dineína es que suministran las cargas a través de la membrana nuclear, hacia adentro y hacia afuera del núcleo (**Fig. 4**). Esto depende de la propiedad de la dineína de interactuar de forma dinámica con la envoltura nuclear permitiendo el ensamblado y reensamblado de la lámina nuclear. Se ha encontrado que los péptidos transportadores de la presente invención podían transportar la

proteína rodamina a través de la envoltura nuclear y de la lámina nuclear, como se demostró en las células transfectadas con lámina B1-GFP (**Fig. 4**).

Después, los péptidos de suministro de la invención tuvieron la capacidad de atravesar la envoltura nuclear para llegar al núcleo. Se acumulan en el nucléolo, o entran en este orgánulo, se mueven y salen de nuevo (**Fig. 5a**). El uso de los péptidos transportadores de la presente invención supera la limitación de los péptidos señal de localización nuclear NLS, que pueden suministrar moléculas al núcleo pero dentro de la fuerte limitación del tamaño del poro nuclear. Se ha sugerido recientemente otra limitación unida a tal direccionamiento específico, dado que algunos protocolos de terapia génica fueron menos eficaces de lo esperado, debido a que el producto suministrado permanecía retenido dentro del núcleo. Esta circunstancia, como se mencionó anteriormente, no se producirá con los péptidos transportadores de la presente invención. No se encontró ni modificaciones de la viabilidad celular ni de la proliferación celular con ninguna formulación del péptido de la presente invención (**Fig. 5 b-e**).

Además, se ensayó el transporte del antígeno de la gripe M2 como carga útil, unido al péptido transportador DynPro (**Fig. 6**). El antígeno de la gripe M2 se ha utilizado en el estado de la técnica como una vacuna de la gripe, pero en la presente invención los inventores utilizaron la vacuna de la gripe M2 fusionada con el péptido transportador objeto de la presente invención. Los inventores muestran que la distribución intracelular y el movimiento del antígeno de la gripe M2 eran coincidentes con el del péptido transportador de la invención, conservando, una vez suministrado, las mismas propiedades antigénicas, como se demostró utilizando un anticuerpo de conejo frente al antígeno de la gripe M2 (**Fig. 6a**). Esto demuestra la capacidad de los péptidos transportadores de la invención de suministrar muchos otros antígenos como vacunas. El estado de la técnica ofrece muchas posibilidades en este aspecto, incluyendo vacunas de subunidades de proteína o de ADN. Los antígenos pueden inducir una respuesta inmunitaria frente a cualquier agente infeccioso y se utilizan en vacunación. Además, actualmente se utilizan antígenos tumorales como vacunas antineoplásicas. En el **Ejemplo 5**, el antígeno de la gripe M2 también se fusionó a nanopartículas funcionalizadas con los péptidos de suministro de la invención y, una vez administrado a ratones, se observó una respuesta de anticuerpos específica, como se representa en la **Fig. 6**. Las inoculaciones en ratones se han llevado a cabo con el péptido M2 unido a uno de los péptidos transportadores de la invención (DynPro), y se observó respuesta inmunitaria de anticuerpos específicos inducida para el antígeno M2 del virus de la gripe, cuando se fusionó con el péptido propulsor ya sea con o sin adyuvantes (**Fig. 6 c-d**). A lo largo del experimento los ratones permanecieron asintomáticos y sanos, estables en peso y temperatura.

También se ensayó cómo los transportadores peptídicos de la invención son útiles para suministrar estructuras de tamaño y complejidad mayores, tales como nanopartículas (**Fig. 7**). Para ese fin, los inventores utilizaron estos péptidos de suministro para funcionalizar nanopartículas de oro-tiopronina (Au@tiopronina, Fluka, Alemania) con tetra-metil-rodamina (TAMRA) como carga útil (**Fig. 7a**). Los inventores seleccionaron nanopartículas de oro-tiopronina debido a que tienen la capacidad de fusionarse adicionalmente con cualquier fármaco o compuesto químico a transportar. La funcionalización de las nanopartículas de oro con los péptidos de penetración celular se había realizado antes, por ejemplo con el péptido Tat. Aunque el péptido Tat puede dirigir los nanomateriales dentro de la célula, muestra baja eficacia. El término "funcionalización", para los fines de la presente invención, se refiere a la adición de grupos funcionales sobre la superficie de dicha "estructura", a modo de ejemplo una nanopartícula, preferentemente mediante métodos de síntesis química, que tuviesen la capacidad de acoplarse a los péptidos de la invención. Esto sería equivalente a instalar un motor o propulsor (un péptido de la invención) en una lancha (cualquier nanopartícula), para la generación de fuerza y el movimiento. Después, la lancha a motor puede cargarse con distintos fármacos (compuestos químicos, productos farmacéuticos) a transportar. Como ejemplo, se ha utilizado tiopronina, un medicamento farmacéutico utilizado en enfermedades renales.

En la presente invención se divulga un procedimiento de única producción de nanopartículas de oro funcionalizadas solubles en agua y estables con los péptidos de unión a dineína de la invención, las nanopartículas así funcionalizadas pueden transportarse de forma muy eficaz dentro de la célula, incluso dentro del núcleo celular. Las nanopartículas de Au@tiopronina se han preparado utilizando el procedimiento de Murray *et al.* (Templeton). Estas nanopartículas comprenden un grupo de oro estabilizado con el aminoácido no natural tiopronina (*N*-2-mercaptopropionilglicina). La tiopronina tiene un grupo -CO₂H terminal libre lo que permitió a los inventores funcionalizar las nanopartículas de oro con las secuencias peptídicas. La reacción se ejecutó en una mezcla metanólica/ácido acético. La codisolución de HAuCl₄ y la tiopronina proporcionó una solución rojo rubí estable. En este punto las condiciones ácidas son muy importantes para garantizar la protonación de los grupos carboxílicos de la tiopropina, y garantizar una monocapa de autoensamblado de tiopronina eficaz y densa que protege a las nanopartículas de oro. La adición del reductor NaBH₄ proporciona una solución oscura mediante la reducción de la sal de oro y la formación de las nanopartículas. Las nanopartículas obtenidas eran solubles en agua y estables en condiciones fisiológicas. El exceso de tiopronina y sales se eliminó mediante diálisis y se caracterizó mediante UV/Vis y microscopía electrónica de transmisión (MET). Las imágenes de MET mostraron un diámetro medio de 2,8 nm para el núcleo de oro de las nanopartículas de Au@tiopronina. Como consecuencia del pequeño tamaño de los grupos, los espectros de absorción UV/Vis mostraron una banda de plasmón superficial (BPS) casi indetectable. La funcionalización adicional de las nanopartículas con moléculas aminadas, tales como tiopronina, se ha llevado a cabo utilizando el procedimiento descrito en el **Ejemplo 5**. Las nanopartículas resultantes se analizaron mediante potencial Zeta, UV/Vis, fluorescencia y espectroscopia de masas (SM), lo que mostró que los péptidos transportadores de la invención se incorporaron a las nanopartículas y lo que mostró no agregación del grupo

después del acoplamiento del péptido.

Como control, los inventores utilizaron en primer lugar nanopartículas de oro-tiopronina simples que transportaban tetrametilrodamina TAMRA sin funcionalización con péptido. En este caso, la señal fue muy baja incluso aumentando la dosis y a lo largo de las primeras tres horas de incubación se internalizaron dentro de las células pocas nanopartículas. Como un segundo control se funcionalizaron nanopartículas de oro-tiopronina con un péptido que no se une a dineína (INTCT3). Estas otras nanopartículas de control permanecieron en su mayor parte en la membrana celular, esbozando el contorno celular. Muy pocas se internalizaron y esas se observaron dispersas en el citoplasma, no en el núcleo.

Por el contrario, las nanopartículas accionadas por el motor celular y su carga útil, tal como las nanopartículas de Au@tiopronina funcionalizadas con un péptido de unión a dineína, se acumularon de forma eficaz dentro de las células y estaban enriquecidas en el área perinuclear (**Fig. 7 b-c**), y conservaron todas las propiedades descritas anteriormente para los péptidos de suministro; tales como la distribución intra- e intercelular, las propiedades de acumulación, la distribución intranuclear y la rápida transferencia a través de los contactos entre células. Las nanopartículas de oro-tiopronina funcionalizadas con un péptido de unión a dineína cargadas con TAMRA (por ejemplo, Au@TioproninaDynPro), se internalizaron rápidamente y presentaron un movimiento rápido a través del citoplasma, hacia las proyecciones celulares, y circularon de célula a célula propagándose a través de las uniones célula-célula (**Fig. 7c**). Además, estas nanopartículas atravesaron la envoltura nuclear y se movieron dentro del núcleo hacia el nucléolo (**Fig. 7b**). El tamaño más grande de las nanopartículas permitió observar una huella de su movimiento a lo largo del núcleo, que fue físicamente evidente utilizando microscopía de campo claro, como protusiones lineales. Estos rastros “de tipo gusano” se observaron a medida que las nanopartículas se movían a través del área nuclear (flechas **Fig. 7b**). Con las nanopartículas funcionalizadas con alguna de las formulaciones del péptido transportador de la invención no se encontraron modificaciones ni de la viabilidad celular ni de la proliferación celular (**Fig. 7 d-e**).

Las propiedades extraordinarias de estas nanopartículas funcionalizadas con péptidos de unión a dineína las hace especialmente apropiadas para cargar cualquier tipo de compuesto, fármaco o producto químico, y logran los requisitos deseados de suministro intracelular a todos los compartimentos, alcanzando el núcleo celular. Esas características, junto con su capacidad de acumulación intracelular, permitirían a su vez reducciones en las dosis de administración de un fármaco dado, debido a su mejor biodistribución. Además, la rápida propagación entre las células de estas nanopartículas motorizadas, que permanecen intracelulares, reduce la exposición al entorno extracelular de cualquier elemento transportado, por lo tanto, minimizando una eventual inmunogenicidad. Esto supera un problema extendido encontrado con los vectores víricos en la terapia génica o la vacunación: la inducción de una respuesta inmunitaria frente al vector vírico o de reacciones no deseadas frente al suero fetal de ternero (SFT), dado de que esos vectores víricos se obtienen, a títulos elevados, en cultivos celulares que contienen SFT (Bao, Moffat).

Existe un puñado de aplicaciones del sistema de suministro objeto de la presente invención. En una realización preferente de la presente invención, se ha aumentado el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas fusionando polietilenglicol (PEG), un polímero de óxido de etileno, con muchas aplicaciones en productos farmacéuticos y en medicina. Es importante mostrar que las nanopartículas PEGiladas, acopladas con los péptidos transportadores/de suministro de la invención, se internalizaron y acumularon en las células hacia el núcleo de forma muy eficaz y se transportaron de célula a célula difundiéndose de forma muy rápida a lo largo del cultivo celular, a pesar de su mayor tamaño (**Fig. 7a**).

Esta capacidad de difusión célula-célula se hace más crucial en el suministro de fármacos en algunas enfermedades infecciosas en las que el agente infeccioso es intracelular (*Salmonella*, *Listeria*, enfermedades víricas) o en patologías en un entorno aislado o menos vascularizado de difícil acceso, tales como: tuberculosis, granulomas, enfermedad ósea, especialmente en tratamientos de la osteoporosis, médula ósea, sistema nervioso. En el campo de las enfermedades infecciosas, los péptidos transportadores/de suministro de la invención tendrían la capacidad de propagarse a las células presentadoras de antígeno de forma muy rápida.

Las nanopartículas de unión a dineína accionadas son especialmente apropiadas para el suministro al sistema nervioso. La dineína axónica es un transportador muy activo a lo largo de los axones. Los inventores han demostrado que pudieron aprovechar su movimiento con el péptido de suministro de unión a dineína en líneas celulares de origen neuronal (**Fig. 1C c-d**). Cualquier molécula unida a la dineína axónica se propagaría de forma rápida a través tanto del sistema nervioso central como del periférico, dependiendo del sitio de inyección. Los tratamientos farmacológicos antiinflamatorios y analgésicos actuales, utilizados en la terapia del dolor, en ocasiones se administran por vía intramedular. Estos fármacos unidos a nanopartículas motorizadas podrían reducir la dosificación de los antiinflamatorios, expandiendo el tiempo para la recidiva de dolor. Podrían beneficiarse del suministro eficaz de fármacos utilizando el sistema transportador/de suministro de la invención otros tratamientos de enfermedades neurodegenerativas, Parkinson, Alzheimer, etc.

Las nanopartículas accionadas por motor molecular serían un método útil para suministrar agentes de terapia génica, en lugar de utilizar vectores víricos (adenovirus, retrovirus), los cuales tienen los efectos secundarios no

deseados mencionados anteriormente. Las nanopartículas accionadas por motor molecular podrían sustituir el uso de los virus como vectores y utilizar, en cambio, las fracciones que utilizan los virus para ser transportados en la célula y alcanzar el núcleo, es decir, el dominio de unión a dineína de una proteína vírica.

5 Una aplicación clara de las nanopartículas motorizadas de la invención sería el aumento de la biodistribución de cualquier producto químico o fármaco. Los tratamientos farmacológicos analgésicos o antiinflamatorios serían más eficaces si se suministraran mediante el sistema de la invención, permitiendo así reducir la dosificación y los efectos secundarios. Para facilitar su amplio espectro de uso, los inventores incluirían un resto avidina en las nanopartículas motorizadas. Esas serían nanopartículas motorizadas adecuadas para los fines perseguidos por el diseño, siendo
10 capaces de transportar cualquier compuesto, producto químico o fármaco unido a la proteína biotina, y de incorporarlo en la nanopartícula en un "clic" (una reacción química de una etapa debido a la afinidad natural de la biotina por la avidina, **Fig. 7a**). Los productos químicos o fármacos a transportar incluyen derivados hormonales, péptidos de enzimas, proteínas, enzimas, antígenos, lípidos, azúcares, ácidos nucleicos y cualquier otra molécula orgánica o inorgánica, ya sea para el uso terapéutico o diagnóstico. El campo de aplicación podría ser las
15 enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, tumores, etc., debido a que este método para suministrar fármacos aumenta la eficacia y reduce de forma simultánea los efectos secundarios, optimizando la distribución, el suministro y el transporte cuando es necesario, lo que permitirá, a su vez, reducir las dosis a administrar y los efectos secundarios no deseados.

20 Esto sería un objetivo crucial para los tratamientos antineoplásicos. Así, los inventores han demostrado el suministro del agente antineoplásico leucovorina unido a nanopartículas de Au@tiopronina funcionalizadas con el péptido de unión a dineína (DynPro). Basado en el mismo principio, los fármacos quimioterapéuticos suministrados mediante nanopartículas motorizadas optimizarían la acumulación del agente quimioterapéutico en las células tumorales y esto permitiría la administración de una dosis activa más baja y minimizar los efectos secundarios.

25 Además, existe un amplio campo de aplicación en el diagnóstico. Las nanopartículas motorizadas de la invención podrían aplicarse para el suministro de trazadores diagnósticos en cualquier célula, órgano o tejido. Las nanopartículas motorizadas fusionadas con moléculas de direccionamiento pueden ser herramientas útiles en los sistemas de detección diagnóstico, incluyendo los sistemas de formación de imágenes, por ejemplo de tumores, en
30 el diagnóstico temprano de la micrometástasis. Los inventores han desarrollado nanopartículas que expresan antígenos tumorales tales como el antígeno carcinoembrionario (ACE) o la telomerasa humana (TERTh). Estos sistemas podrían utilizarse en experimentos de vacunación antineoplásica.

Además, puede desarrollarse un tratamiento antineoplásico específico fusionando un péptido inhibidor de la
35 telomerasa humana (TERTh) con las nanopartículas accionadas por motores moleculares de la presente invención. Como indica el estado de la técnica, esta secuencia es eficaz cuando se expresa en células cancerosas. PinX1 y su dominio pequeño TID se unen a la subunidad catalítica de la telomerasa TERTh e inhiben de forma potente su actividad (Zhou). Ha sido denominado como supuesto supresor tumoral relacionado con el hígado (LPTS, siglas del inglés *liver-related putative tumor suppressor*). Además, se ha demostrado su actividad antitumoral (Liao). En la
40 presente invención los inventores han incorporado el péptido inhibidor de la TERTh a las nanopartículas motorizadas, lo que constituye una estrategia completamente nueva en esta terapia frente al cáncer. Esto eludirá el problema de muchas terapias antineoplásicas que solo alcanzan partes del tumor debido a la mala y anormal vascularización de las células tumorales. Las nanopartículas accionadas por motor de la invención potenciarían la difusión de cualquier fármaco o fracción antineoplásica unido a ellas, y potenciaría la acumulación en células
45 tumorales.

De forma similar, fusionando el antígeno, el péptido de la telomerasa humana (TERTh), a las nanopartículas accionadas por motores moleculares de la invención, se desarrolla una vacuna potenciada antineoplásica de propagación.

50 La dineína y las proteínas asociadas funcionan también en la polarización, migración y crecimiento celulares y facilitan la migración de los fibroblastos. Por consiguiente, los péptidos de unión a dineína objeto de la presente invención, serían útiles basados en sus propiedades exclusivas, ya sea por sí mismos o potenciando productos químicos, fármacos o factores de crecimiento utilizados en la cicatrización, para acelerar la curación de quemaduras, facilitando así la reparación tisular.

Además, la dineína está implicada en la formación de los conos de crecimiento en las neuronas. Por lo tanto, los péptidos de unión a dineína de la invención serían útiles además para suministrar y para estimular el crecimiento de los nervios. Por lo tanto, podrían aplicarse por sí solos o en combinación con otros fármacos o factores de
60 crecimiento nervioso en el daño nervioso periférico o de la médula espinal, estimulando el crecimiento y los procesos de reparación tisular.

Por lo tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a péptidos que se unen a una proteína del complejo motor microtubular celular, tal como la dineína, para su uso en el transporte y/o el suministro de sustancias
65 a cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende la difusión célula a célula. En una realización preferente de la invención, el péptido de unión a dineína comprende cualquier secuencia de

aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia).

Los péptidos de la presente invención muestran la característica común principal el ser capaces de “secuestrar”, unirse o involucrar este sistema de transporte celular natural a través de la unión a una de estas proteínas del complejo motor microtubular.

A los fines de la presente invención, el término “sustancia” se refiere a cualquier materia que pueda suministrarse mediante los péptidos de unión a proteína motora de la invención, por ejemplo (listado no exhaustivo): sustancias orgánicas, preferentemente seleccionadas de derivados hormonales, factores de crecimiento, péptidos, proteínas, polímeros, polisacáridos, enzimas, antígenos, lípidos, ácidos nucleicos, fármacos, productos farmacéuticos, flagelina de *Salmonella*, fármacos antiinflamatorios, fármacos analgésicos, interferones, citocinas, anticuerpos, agentes antitumorales o terapéuticos, indicadores diagnósticos, los agentes antitumorales leucovorina o péptidos inhibidores de TERT, antígenos TERT, M2 del virus de la gripe o el ACE; o sustancias inorgánicas, preferentemente metales, oro, óxido de hierro o compuestos magnéticos.

A los fines de la presente invención, la expresión “compartimento celular” se refiere al emplazamiento en donde dichas “sustancias” se pueden suministrar de forma eficaz, comprendiendo todas las partes encerradas dentro de una célula, cuyo lumen habitualmente está rodeado por una membrana mono- o bicapa lipídica, en particular el compartimento nuclear que comprende el núcleo y la envoltura nuclear, los orgánulos y el citosol, y de forma más particular el nucléolo, las vesículas, las vacuolas, el centriolo y también las uniones y conexiones célula a célula.

Otra realización de la presente invención se refiere a una estructura funcionalizada con un péptido de unión a una proteína motora. El término “estructura” se refiere a cualquier entidad a la que los péptidos de la invención pueden unirse, por ejemplo: nanopartículas, dendrímeros, virus, liposomas, micelas, armazones, redes, superficies o matrices. En una realización preferente de la invención, la presente invención se refiere a nanopartículas funcionalizadas con un péptido de unión a dineína que preferentemente comprende las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia). Dichas nanopartículas pueden comprender adicionalmente adyuvantes, preferentemente PEG, otros polímeros, protamina o avidina.

Además, a los fines de la presente invención, “funcionalización” significa cualquier modificación de la superficie, es decir, el acto de modificar la superficie de un material aportando características físicas, químicas o biológicas, distintas de las encontradas de forma original en la superficie de dicho material. Esta modificación se realiza habitualmente en materiales sólidos, pero es posible encontrar ejemplos de la modificación de la superficie de líquidos específicos. La modificación puede realizarse mediante distintos métodos, con miras a modificar un amplio intervalo de características de la superficie, tales como: rugosidad, hidrofobicidad, carga superficial, energía superficial, biocompatibilidad y/o reactividad, entre otros.

Otra realización de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende un péptido con la capacidad de unirse a una proteína del complejo motor microtubular, tal como la dineína, o una estructura funcionalizada unida a un péptido con la capacidad de unirse a una proteína del complejo motor microtubular, tal como la dineína, en ambas realizaciones acoplada a al menos una sustancia a suministrar en cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende la difusión célula a célula. En una realización preferente, la estructura funcionalizada con un péptido con la capacidad de unirse a una proteína del complejo motor microtubular es una nanopartícula. En otra realización preferente de la invención, la composición farmacéutica comprende un péptido de unión a dineína que comprende las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), o una estructura funcionalizada unida a un péptido de unión a dineína que comprende las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), acoplada a una sustancia a suministrar en cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende la difusión célula a célula.

La composición farmacéutica anterior puede ser una composición de vacuna que comprende un péptido con la capacidad de unirse a una proteína del complejo motor microtubular, preferentemente un péptido de unión a dineína que comprende las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), o una estructura funcionalizada unida a un péptido de unión a dineína que comprende las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), en ambas realizaciones, acoplado a un antígeno a suministrar en cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende la difusión célula a célula; o una composición antiviral que comprende una estructura funcionalizada unida a un péptido de unión a dineína que comprende las SEQ ID NO: 1 a 11 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10 citadas como ejemplos de referencia), a suministrar en cualquier diana requerida, en cualquier compartimento celular requerido, que comprende la difusión célula a célula.

El conjunto de enfermedades que pueden tratarse, diagnosticarse o prevenirse con la composición farmacéutica de la invención depende de forma directa de la sustancia específica a ser suministrada mediante los péptidos de la invención. Como se cita anteriormente, dado que pueden suministrarse sustancias orgánicas o inorgánicas, pueden tratarse, diagnosticarse o prevenirse un amplio conjunto de enfermedades con la composición farmacéutica de la

invención, por ejemplo (listado no exhaustivo): cáncer y otras neoplasias, enfermedades infecciosas, tuberculosis, granulomas, enfermedades óseas, osteoporosis, enfermedad congénitas, defectos enzimáticos ya sea adquiridos o hereditarios, enfermedades endocrinas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades de la médula ósea, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades neurodegenerativas, tratamiento del dolor, cicatrización, curación de quemaduras o enfermedades inflamatorias.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

A. Eficacia de la captación celular de una proteína propulsada mediante el péptido de suministro de una carga. Localización de los péptidos que se unen a la proteína del complejo motor microtubular dineína frente al control que no se une a una proteína motora. 1A a, c: La captación celular de la proteína de carga rodamina unida al péptido DynPro (propulsado por la dineína) se observa como puntos distribuidos en el citoplasma (5 μ M). 1A b,d: Rodamina unida al péptido de control INTCT3 en cultivo de células Vero sembradas en placa después de 18 h de exposición a los péptidos. 1A e: Otras secuencias que se unen a una proteína del complejo motor microtubular. Acumulación celular después de la incubación de células las Vero con el péptido TransRB. 1A f: Células incubadas con TransBA. La distribución subcelular y las propiedades dinámicas de todas las secuencias de unión a dineína probadas fueron las mismas con todos los péptidos de unión a dineína.

B. Grupo de péptidos de unión a dineína en el área perinuclear, cerca del centro organizador de microtúbulos (COMT; **Fig. 1B c** flecha) que sigue del movimiento de la proteína motora dineína unida a los microtúbulos. **1B a-c:** Acumulación temporal progresiva de rodamina cuando está unida al péptido de unión a dineína en cultivo de células Vero sembradas en placa después de 30-120 min de incubación con los péptidos. **1C a,b:** Células HEK293T después de 1 hora de incubación con el péptido de unión a dineína. **1C c,d:** Línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC después de 1 h de incubación con el péptido. El péptido se movió rápidamente a través del citoplasma y de célula a célula (puntas de flecha). Los péptidos de unión a dineína presentaban la misma distribución subcelular, capacidad de transporte intercelular y propiedades dinámicas en un amplio intervalo de tipos celulares probados.

Figura 2. Los péptidos de unión a la proteína motora molecular dineína suministran cargas de célula a célula. La proteína rodamina unida a los péptidos transportadores/de suministro de la invención se transporta de forma activa a través de las uniones y conexiones célula-célula mediante uniones adherentes, filopodios y procesos celulares. Este bombeo de la proteína hacia afuera la hace que se propague de forma rápida entre las células por todo el cultivo celular. 2a: Movimiento de entrada a la célula siguiendo una extensión del microtúbulo. 2 b-f: Propagación del péptido a través de las conexiones y proyecciones entre células. La figura muestra las células Vero después de la incubación con el péptido de suministro DynPro 10 μ M, contrateñidas con 2 a-c: un anticuerpo anti-cadena ligera de dineína (DLC8) 2d: anticuerpo anti-tubulina 2e: anticuerpo de (cadena intermedia de dineína) que es otra cadena de dineína que forma parte del complejo motor microtubular junto con las cadenas pesadas, intermedias ligeras y ligeras. 2f: con aglutinina de germen de trigo (AGT-488), que marca la superficie celular, los contactos célula-célula y los procesos.

Figura 3: El movimiento rápido del péptido de suministro es un movimiento asociado a microtúbulos.

3A a-c: El movimiento de transporte del péptido de suministro se anuló añadiendo a los medios de cultivo un fármaco despolimerizante de microtúbulos, nocodazol 2,5 μ M, durante 30 min (3Aa: 0 s, b: 4 s, c: 8 s). 3Ad-f: Después, se retiró el medio y después del lavado se recuperó el movimiento del péptido de suministro, y el péptido de suministro continuó propagando la proteína rodamina en las células (3Ad: 8 s, 3Ae: 16 s, 3Af: 24 s). 3B: Por el contrario, los fármacos despolimerizantes de actina produjeron una contracción de la célula apreciable debido al colapso del citoesqueleto de actina, pero se preservó el transporte y se registró el péptido de suministro moviéndose a lo largo de las células y de las proyecciones que quedaban (latrunculina A 0,1 μ M) 3Ba: Sin fármaco, 3Bb: después de 15 min de incubación con el fármaco, 3Bc: 30 min. Se añadió DynPro 10 μ M a las células vero y después de 30 min se añadieron los medios que contenían los fármacos despolimerizantes del citoesqueleto.

Figura 4. Los péptidos de unión a dineína tienen la capacidad de suministrar cargas a través de la membrana nuclear. 4a: El suministro de rodamina a través de la membrana nuclear se observa como rastros de péptidos dentro del núcleo. 4 b-c: La envoltura nuclear se tiñó con lámina B1-GFP. 4b: la envoltura nuclear aparece discontinua cuando los péptidos están atravesándola. 4c: Imágenes subsecuentes de videomicroscopía que muestran los péptidos que atraviesan la envoltura nuclear y las arrugas de la envoltura nuclear a medida que los sitios de la alteración por el péptido se reorganizan. 4d: Reconstrucción tridimensional de la cubierta de la envoltura nuclear que muestra que los péptidos entran al núcleo. 4e: Arrugas de la envoltura nuclear en los sitios de entrada. La figura representa células vero transfectadas con lámina B1-GFP y tratadas con péptido DynPro 10 μ M.

Figura 5. Los péptidos de unión a dineína suministran cargas en el nucléolo. 5a: Videomicroscopía a

intervalos regulares de 1 imagen/s de células Vero transfectadas con nucleolina B3-GFP después de 1 h de incubación con DynPro 10 μ M. Las flechas muestran el tráfico del péptido de suministro hacia adentro y hacia afuera del nucléolo teñido con nucleolina. 5 b-c: La viabilidad celular no estuvo afectada con dosis crecientes de péptido de unión a dineína o de control, por sí mismos o unidos a TAMRA. 5 d-e: La proliferación celular no se modificó con dosis crecientes del péptido de unión a dineína o del control, por sí mismos o unidos a TAMRA.

Figura 6. El antígeno suministrado por el péptido de unión a dineína provoca una respuesta inmunitaria de anticuerpos eficaz. 6a Células vero cargadas con el péptido DynPro unido al antígeno M2 de la gripe. 6b: Con un anticuerpo que reconoce el antígeno M2 de la gripe, fue posible detectar en las mismas células el suministro y la amplia distribución intracelular del antígeno. 6 c-e: La respuesta de los anticuerpos provocada en ratones por las distintas preparaciones del péptido y del control (Preinm), después de la primera y la segunda inoculación. Grupo A: 2 μ g de DynPro con el adyuvante incompleto de Freund (AIF). Grupo B: 2 μ g de M2 con AIF. Grupo C: 2 μ g de M2-DynPro con AIF. Grupo D: 2 μ g de M2- DynPro. 6e: Comparación de los títulos IgG por ELISA obtenidos en los distintos grupos de ratones inoculados con las preparaciones del péptido y de los controles. El eje X representa cada uno de los animales de cada uno de los grupos en la primera (barras grises) y la segunda inoculación (barras negras).

Figura 7. Nanopartículas funcionalizadas con el péptido de unión a dineína. 7a: Esquema de la estructura de la nanopartícula; las propiedades motoras del péptido de suministro actúan como un propulsor para las nanopartículas de Au-tiopronina. Este tipo de estructura tiene la capacidad de transportar trazadores diagnósticos (TAMRA), polímeros (PEG), antígenos y otros compuestos químicos. 7b: Las nanopartículas de Au-tiopronina-TAMRA funcionalizadas con el péptido de suministro de unión a dineína DynPro se incubaron con las células Vero durante 1 hora. Flecha: La nanopartícula que entra al núcleo deja una huella visible a lo largo de su trayecto debido a su tamaño más grande con el contraste de fase. 7c: Nanopartículas de Au-tiopronina-TAMRA funcionalizadas con péptido de suministro de unión a dineína incubadas durante 2 h. La acumulación de rodamina es visible en el citoplasma y las proyecciones célula-célula. 7 d-e: La proliferación celular no se modificó con dosis crecientes de las distintas formulaciones de nanopartículas.

Figura 8.

A. Dominio de unión a dineína de la miosina V, TransMy. La videomicroscopía de molécula única mostró que estos péptidos entran al núcleo mediante el remodelado de la envoltura nuclear, se transportan a través de la envoltura nuclear y alcanzan el nucléolo en células Vero y en otros tipos celulares.

B. Se funcionalizaron nanopartículas de oro con TransMy como una herramienta para el suministro de genes/fármacos en el citoplasma y el núcleo celular. Las nanopartículas prolongan la biodisponibilidad del péptido y confieren estabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad, no teniendo efecto adverso sobre la viabilidad o la morfología celular. También permiten la detección mediante microscopía electrónica o reconocimiento molecular. Además, dos pcDNA que contenían la proteína de HA1 de la gripe (pcAPCH-Lk1-HA1) y la proteína M2 de la gripe (pcAPCH-Lk1-4M2) respectivamente, se incorporaron a las nanopartículas Au@p3k-TransMy en una proporción de 0,1 mg de plásmido por mg de nanopartícula, a los fines del suministro y la expresión de proteínas. La videomicroscopía de molécula única muestra la distribución de las nanopartículas dentro de la célula y alcanzando el núcleo.

C. Para mostrar la expresión de la proteína, las nanopartículas Au@p3k-TransMy-pcAPCH-Lk1-HA1 incubadas en células Vero se analizaron por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal frente a HA1.

D. Para mostrar la expresión de la proteína, las nanopartículas Au@p3k-TransMy-pcAPCH-Lk1-4M2 incubadas en células Vero se analizaron mediante inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal frente a M2.

E. Mapa de pcAPCH-Lk1-HA1 (7345 PB) (SEQ ID NO: 13).

F. Mapa de pcAPCH-Lk1-4M2 (6600 PB) (SEQ ID NO: 14).

Ejemplos

Ejemplo 1. Suministro de la proteína rodamina mediante su unión a las secuencias que se unen a la dineína motora citoplasmática del péptido transportador en células Vero.

1.1. MATERIALES

1.1.1 Líneas celulares y medios de cultivo utilizados.

A lo largo de este ejemplo se ha utilizado como modelo la línea celular Vero. Las pruebas de los péptidos se desarrollaron en esta línea celular establecida, aneuploide y de crecimiento indefinido en cultivo. Procede de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus*) adulto y se obtuvo a través de la Colección Europea de Cultivos Celulares (CCEC), depositada con el número 84113001. Su morfología es del tipo de fibroblastos y se cultivó utilizando medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza), complementado con suero fetal bovino al 5 % (SFB, Lonza)

inactivado durante 30 minutos a 56 °C, glutamina 4 mM (Invitrogen), penicilina 200 UI/ml y estreptomicina 100 mM (Invitrogen). Las condiciones de cultivo de las células fueron a 37 °C y una atmósfera de CO₂ al 5 %. De forma rutinaria, estas células se subcultivaron 1:6 dos veces por semana, en matraces de cultivo Easy-T-Flasks de 75 cm² recubiertos con Nunclon® (Nunc). El medio de cultivo DMEM se complementó de varias formas, dependiendo de los requerimientos particulares del ensayo. Por lo tanto, los inventores se refieren a DMEM SC cuando se utilizó sin antibióticos, glutamina o SFB. Los inventores se refieren a DMEM al 2 % cuando el porcentaje de SFB es añadido en este porcentaje, manteniendo los otros aditivos en las concentraciones mencionadas.

1.1.2. Material fungible utilizado.

- Criotubos de 1 ml de capacidad (Nalgene) para mantener la línea celular Vero en nitrógeno líquido.
- Micropipetas (Gilson) con capacidades máximas de 1000, 200 y 20 µl.
- Puntas de micropipeta (Arc) con filtro y libres de ARNasas, para evitar posibles contaminaciones, de 1000, 200 y 20 µl de capacidad.
- Tubos de 1,5 ml de capacidad (Eppendorf) libres de ARNasas.
- Placas de cultivo celular multipocillo de 4, 6, 12 y 24 pocillos (Nunc).
- Cubreobjetos de 12 mm de diámetro y portaobjetos rectangulares convencionales (Laboratorios Geber).

1.1.3. Anticuerpos y cromógenos utilizados.

- el anticuerpo policlonal anti-DLC8 obtenido en conejos inmunizados con la proteína DLC8 unida a 10 restos histidina, expresada en *E. coli* y más tarde purificada, se utilizó a una dilución 1:50. Generado en el laboratorio de los inventores.
- Anticuerpo monoclonal anti α -tubulina (1:2000, Sigma).
- Aglutinina de germen de trigo (AGT) conjugada al fluorocromo Alexa 488 (1:200, Invitrogen).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo Alexa 594 y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo Alexa 488 (1:200 y 1:300 respectivamente, Molecular Probes).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa HRP y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa HRP (ambos 1:5000-10.000, GE Healthcare).

1.1.4 Plásmidos.

El vector que codifica EGFP-Lámina B1 fue un obsequio generoso de Howard Worman de la Columbia University, Nueva York. Loren Fong de la UCLA proporcionó amablemente el vector que codifica la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP)-LBR (receptor de Lámina B). EGFP-tubulina y -actina eran de Clontech. Carmen Rivas del Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, proporcionó amablemente el vector que codifica la proteína nucleolar B23.

1.1.5. Otros reactivos.

- Triton X-100, Tween 20, seroalbúmina bovina (BSA), solución salina tamponada con fosfato (PBS) B-mercaptoetanol, SDS, Tris base (Sigma)
- Agua libre de ARNasa y solución RNaseZAP (Ambion) para eliminar la actividad ARNasa de las superficies de trabajo y de los materiales.
- ProLong, reactivo de montaje para conservar la fluorescencia (Invitrogen).

1.1.6. Péptidos utilizados.

Se utilizaron: un péptido que contenía el motivo de unión a DLC8 descrito anteriormente en la proteína p54 (DynPro) del virus de la fiebre porcina africana, la proteína P (TransRb) del virus de la rabia y Va (TransMy) de la miosina, y otros péptidos con secuencias de aminoácidos aleatorias irrelevantes con una cola de argininas como controles negativos (péptido INTCT3) (**Fig. 1A**). Los péptidos se unieron a la proteína rodamina B (extremo C-terminal o N-terminal) o a tetrametil-rodamina (TAMRA), en una cadena lateral del aminoácido lisina, como se describe en la **Tabla 1**.

Genecust sintetizó todos los péptidos diseñados utilizados a lo largo del presente ejemplo. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante HPLC, obteniendo en todos los casos un grado de pureza de más del 95 %. Una vez sintetizados y purificados, los péptidos se recibieron en el laboratorio como un liofilizado.

MÉTODOS

1.2.1 Manipulación de los péptidos.

Los péptidos se resuspendieron de acuerdo con su peso molecular en el volumen de H₂O con el correspondiente grado de pureza mQ y estéril, para obtener una solución madre a una concentración de 5 mM. Se puso especial

atención para evitar la turbidez en la solución y las puntas siempre se utilizaron con un filtro, para evitar posibles contaminaciones cruzadas. Se prepararon alícuotas de 20 μ l y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su uso. Para utilizarlas, su descongelamiento fue lento, en hielo.

- 5 Las soluciones de trabajo de los péptidos se prepararon a partir de las soluciones madre en medio DMEM SC (PS al 1 %, G al 1 %, sin SFB) en el intervalo de concentraciones de 0 - 100 μ M, siempre en condiciones estériles y justo antes de su adición al cultivo celular para evitar su degradación.

1.2.2 Incubación de los péptidos en el cultivo celular.

- 10 La noche anterior al experimento se cultivaron 9×10^4 células Vero en placas de 24 pocillos. A la mañana siguiente, las células se lavaron en DMEM SC y el medio existente se reemplazó con 300 μ l de las soluciones que contenían los distintos péptidos en distintas concentraciones. La incubación de las células con los péptidos tuvo lugar durante distintos periodos de tiempo, variando entre 1 min a 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % (**Fig. 1**).

1.2.3. Análisis de citotoxicidad. Ensayos de viabilidad y proliferación celular.

- 15 Para evaluar la viabilidad celular se incubaron las células Vero, sembradas en las placas de 24 pocillos, en DMEM que contenía los péptidos de suministro DynPro, etc. o INTCT3 de control negativo unido a rodamina B o TAMRA, a concentraciones que variaban de 0 a 100 μ M (**Fig. 5b-c**). Después de la incubación con los péptidos durante 24 h, las células se recogieron y mediante ensayo de exclusión del colorante azul de Tripán (Sigma) se determinó el número de células viables presentes en las suspensiones celulares. Brevemente, se añadieron 20 μ l de PBS con azul de Tripán al 0,08 % a un volumen equivalente de suspensión celular y se mezcló. Después de 2 minutos se contaron las células azules (células muertas) utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico convencional (**Fig. 5 b-c**).

- 25 Para evaluar la proliferación celular, se incubaron 3×10^4 células Vero, sembradas en placas de 96 pocillos, en 50 μ l de DMEM que contenía los péptidos de suministro DynPro, etc. o INTCT3 de control negativo a concentraciones que variaban entre 0 a 100 μ M. Después de una incubación de 36 h, se determinó la proliferación celular utilizando el ensayo CellTiter 96 Aqueous™ (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante (**Fig. 5d-e**).

1.2.4. Inmunofluorescencia.

- 35 Las células expuestas anteriormente a los péptidos se lavaron con PBS antes de fijarlas con una solución de PBS-paraformaldehído al 3,8 % a temperatura ambiente (TA) durante 10 min. Después del lavado con PBS, las células se permeabilizaron utilizando PBS-Triton X-100 al 0,1 % durante 10 min a TA. Después del lavado con PBS, las células se incubaron en solución de bloqueo (PBS-seroalbúmina bovina al 2 %) a 37 °C durante 45 min. Los anticuerpos primarios se incubaron a las correspondientes diluciones durante 1 h a 37 °C. Después del lavado en PBS, las células se incubaron durante 30 min a TA con el anticuerpo secundario a las concentraciones deseadas durante 45 min a temperatura ambiente. Se montaron los cubreobjetos con Prolong y se observaron en un microscopio confocal (Leica; **Fig. 2**). Los microtúbulos se detectaron mediante tinción con el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Sigma) diluido 1:1.000. Se generó un suero de conejo específico frente a DLC8 después de la inmunización con DLC8 no marcada producida en *E. coli*, como se describe en los Materiales. Este suero se diluyó 1:100 en PBS para detectar la distribución celular de DLC8. Se utilizaron como anticuerpos secundarios anticuerpos anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados con Alexa 594 (Molecular Probes), diluidos 1:200 en PBS. Los contactos célula-célula y las membranas celulares se marcaron con aglutinina de germen de trigo (AGT) conjugada con el fluorocromo Alexa 488 diluida 1:200 en PBS (**Fig. 2**).

1.2.5. Transfecciones.

- 50 Las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo de transfección TransIT 2020 de Mirus, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células Vero se cultivaron en placas de cultivo tisular de 35 mm, en DMEM con suero al 5 % (PS al 1 %, G al 1 %), hasta el 80 % de confluencia. De forma separada, se mezclaron 50 μ l de DMEM, sin suero y sin antibióticos, con 0,5 μ g de ADN de cada plásmido y 1,5 μ l de TransIT 2020. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente antes de la adición de las células. Para minimizar la citotoxicidad y aumentar la eficacia de la transfección, antes de añadir la mezcla de ADN-TransIT el medio de las células se reemplazó con 300 μ l de DMEM recién preparado con suero al 5 % y sin antibióticos. De forma similar, después de 4 h la mezcla de transfección se retiró de las células y se añadieron 500 μ l de medio recién preparado con suero al 5 % (PS al 1 %, G al 1 %). A las 24 h después de la transfección, las células se incubaron con los péptidos según se explica anteriormente y se analizaron mediante microscopía confocal.

1.2.6. Fármacos inhibidores.

- 65 Se utilizaron inhibidores de la polimerización de microtúbulos para demostrar que el movimiento del péptido suministrado fue el movimiento esperado dependiente del motor microtubular (**Fig. 3A**). Se incubaron las células

Vero al 100 % de confluencia en una placa de 35 mm con DynPro a 10 μ M (en 500 μ l de DMEM SFB) durante 30 min en un microscopio confocal a 37 °C y CO₂ al 5 %, y se registró el movimiento de suministro intra e intercelular. Después, se añadió al medio nocodazol 2,5 μ M y se incubó adicionalmente a 37 °C y CO₂ al 5 %, y se registró el movimiento asociado a los microtúbulos. Después de aproximadamente 30-15 min el efecto del fármaco sobre las células fue apreciable y el movimiento se detuvo. Después de 2,5 h el medio se reemplazó por medio recién preparado y se registró en el microscopio durante 1 h, y se registró la recuperación del movimiento (**Fig. 3A**).

Para comprobar su impacto en el movimiento, se utilizaron inhibidores de la polimerización de la actina, como la latrunculina A (**Fig. 3B**). Se incubaron las células Vero al 100 % de confluencia no transfectadas o transfectadas con actina en un MW4 con péptido DynPro a 50 μ M (en 500 μ l de DMEM, SFB-), durante 30 min a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después, se añadió latrunculina A (0,1 μ M) o PBS en los controles, y se incubó durante 1,5 h a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después del lavado con PBS, las células se montaron en reactivo antidecoloración ProLong Gold.

1.2.7. Microscopía de video a intervalos regulares.

Se llevó a cabo microscopía confocal utilizando un microscopio confocal TCS SPE de Leica que incluía una cámara de incubación, un controlador de CO₂ y una unidad de calefactora. Para la observación del movimiento *in vivo*, se registraron series apiladas cada 10 segundos utilizando el programa Microsystems LAS AF de Leica y las películas se presentaron a 1-5 imágenes por segundo.

En conclusión, el **Ejemplo 1** muestra que las secuencias del péptido que se unen a una proteína del complejo motor microtubular celular, tal como el motor molecular dineína, pueden utilizarse de forma eficaz para diseñar un conjunto de péptidos transportadores que dirijan el movimiento intracelular unido a los microtúbulos (**Tabla 1**). Estos péptidos transportadores propulsados por motor molecular tuvieron la capacidad de transportar, con elevada eficacia, cualquier molécula o fármaco unido a ellos. La proteína rodamina B o a tetra-metil-rodamina (TAMRA) se unieron como una carga útil al péptido de suministro y se añadieron a las células Vero. Su movimiento se registró mediante videomicroscopía a intervalos regulares y se comparó con el de la rodamina unida a los péptidos de control con la secuencia de aminoácidos que no se une a dineína (INTCT3 de control interno; **Fig. 1A b,d**). La captación celular de rodamina B fue mucho más eficaz, y las proteínas fluorescentes se acumularon de forma rápida en el citoplasma de las células tratadas cuando estaban unidas a los péptidos de unión a dineína probados (propulsadas por dineína), como se puede observar en la **Fig. 1A a,c**, para el péptido Dinpro y en la **Fig. 1A e,f**, para los péptidos TransRB y TransBA, respectivamente. Las proteínas se distribuyeron cerca del núcleo y en el área del centro organizador de microtúbulos o se dispersaron a través del citoplasma (**Fig. 1, 2**). No se encontró ni toxicidad celular ni modificaciones de la proliferación celular (**Fig. 5b-e**).

Además, los transportadores peptídicos tuvieron la capacidad de atravesar la envoltura nuclear para entrar en el núcleo (**Fig. 4, 5**). Los inventores encontraron que los péptidos transportadores pudieron transportar proteínas fluorescentes a través de la envoltura nuclear y de la lámina nuclear, como se muestra en las células transfectadas con lámina B1-GFP (**Fig. 4**). Se ha demostrado que estos péptidos de suministro pueden acumularse en el nucléolo o moverse y salir otra vez, como se demostró en células transfectadas con un plásmido que codificaba la proteína nucleolar B23 (**Fig. 5a**).

La proteína rodamina B o TAMRA unida a los péptidos de suministro se transportaron de forma activa a través de las uniones y de las conexiones célula-célula mediante uniones adherentes, filopodios y procesos celulares. Este bombeo hacia afuera de la proteína dio como resultado la rápida propagación entre las células (**Fig. 1-3**).

Se demostró que el transporte del péptido de suministro es dependiente de los microtúbulos, dado el característico movimiento dependiente de dineína y que se detuvo con los fármacos despolimerizantes de microtúbulos como nocodazol, y que el transporte se recuperó después del lavado del fármaco (**Fig. 3A**). No obstante, otros agentes despolimerizantes del citoesqueleto de actina (latrunculina A) no tuvieron impacto sobre este transporte, como se esperaba, debido a que no están relacionados (**Fig. 3B**).

Ejemplo 2. Suministro de la proteína rodamina mediante su unión a las secuencias del péptido transportador que se unen a la dineína motora citoplasmática en células de diversos orígenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

La mayoría de los materiales y métodos fueron equivalentes a los del ejemplo anterior, con las siguientes peculiaridades:

2.1. Líneas celulares y medios de cultivo utilizados.

En este ejemplo, los inventores probaron diversas líneas celulares de distintos orígenes para el uso de los péptidos suministrados.

a) La línea celular HEK 293T/17 (Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC n.º CRL-11268) procede de células de riñón embrionario humano transformadas con adenovirus 5 y contiene, además, el antígeno T grande de SV40. Las células HEK 293 y varias otras líneas celulares humanas generadas mediante transformación con adenovirus de las células de riñón embrionario humano tienen la morfología (**Fig. 1Ca-b**) y muchas propiedades de las neuronas inmaduras, tal como la presencia de ARNm y de productos génicos encontrados normalmente en las neuronas.

Esta línea celular se cultivó utilizando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza), complementado con suero fetal bovino (SFB, Lonza) al 5 %, inactivado durante 30 minutos a 56 °C, glutamina 4 mM (Invitrogen), penicilina 200 UI/ml y estreptomycin 100 mM (Invitrogen). Las condiciones de cultivo de las células fueron a 37 °C y una atmósfera de CO₂ al 5 %. De forma rutinaria, estas células se subcultivaron 1:6 dos veces a la semana, en matraces de cultivo Easy-T-Flasks de 75 cm² recubiertos con Nunclon® (Nunc). El medio del cultivo DMEM se complementó de varias formas dependiendo de los requerimientos particulares del ensayo. Por lo tanto, los inventores se refieren a DMEM SC cuando se utilizó sin antibióticos, glutamina o SFB. Los inventores se refieren a DMEM al 2 % cuando el porcentaje de SFB se añade en este porcentaje, manteniendo los otros aditivos en las concentraciones mencionadas.

b) La línea celular SK-N-MC de células de neuroblastoma humano (ATCC HTB-10) de origen neurogénico y con actividad dopamina beta hidrolasa. Esta línea celular se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle con piruvato. El procedimiento y la composición fueron similares a los de la línea celular anterior (**Fig. 1Cc-d**).

c) La línea celular COS-7 de riñón de mono verde africano obtenida de CV-1, una línea celular de simio (*Cercopithecus aethiops*), mediante transformación con un mutante de origen defectivo del SV-40. Morfología de fibroblastos. N.º de ATCC CRL-1651, EC ACC 60. Esta línea celular se cultivó como se explica para a).

d) La línea MDCK de células epiteliales de riñón de canino Madin-Darby. Células de origen epitelial, positivas para queratinas y rodeadas de lámina basal. ATCC CCL-34. Esta línea celular se cultivó como se explica para a).

e) Línea celular inmortal HeLa obtenida de células epidérmicas de cáncer de cuello uterino. Origen epitelial, expresa queratinas. ATCC CCL-2. Esta línea celular se cultivó como se explica para a).

f) Células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO no expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). ATCC CCL-61. Esta línea celular se cultivó como se explica para a), añadiendo en el medio prolina 4 mM (Invitrogen).

g) La línea celular de macrófagos humanos THP1 (ATCC TIB-202) se cultivó en suspensión con medio RPMI-1640. Las células se sembraron 24 horas antes del tratamiento con el péptido y se añadió acetato de forbol miristato al 5 % (PMA, Lonza).

h) La línea celular de linfocitos humanos KARPAS-422 procedente de células de linfoma no Hodgkin se cultivó en suspensión con medio RPMI-1640 (ICLC: HTL99023).

i) Línea de células de insecto SF9: las células SF9 proceden de *Spodoptera frugiperda* (oruga cogollera) (ATCC CRL-1711).

En conclusión, el **Ejemplo 2** muestra que los péptidos de unión a dineína del complejo motor microtubular son útiles para el suministro satisfactorio de sustancias en muchos tipos celulares distintos, procedentes de distintos orígenes tisulares: fibroblastos, células epiteliales, macrófagos, linfocitos, etc. y de distintas especies (ser humano, mono, hámster, perro) y tanto transformadas como no transformadas. Esto apoya la aplicación de los péptidos de suministro de unión a dineína en células procedentes de tumores sólidos (carcinoma epidérmico de cuello uterino) o de neoplasias hematológicas (linfoma no Hodgkin).

Ejemplo 3. Suministro del antígeno M2 del virus de la gripe mediante su unión a una secuencia del péptido transportador (DynProp) que se une a la dineína motora citoplasmática.

Los materiales y métodos de este ejemplo son coincidentes con el **Ejemplo 1**, excepto en los siguientes puntos:

3.1 Péptidos utilizados.

Se utilizó un péptido que contenía el motivo de unión a DLC8 descrito anteriormente en la proteína p54 del VFPA (DynPro) y unido al péptido M2 del virus de la gripe. Esta es una proteína interna del núcleo del virus de la gripe se ha caracterizado recientemente como responsable de la generación de la respuesta del inflammasoma en las células durante la infección. Este péptido actualmente se incluye en algunas formulaciones nuevas de vacuna frente a la gripe, junto a la hemaglutinina, o solo. Como controles negativos se incluyeron otros péptidos con secuencias irrelevantes (péptido INTCT3). Todos se unieron a la proteína tetrametil-rodamina (TAMRA) y se describen en la **Tabla 1**.

La fuente, la manipulación de los péptidos y otros métodos, fueron los mismos que los descritos en el **Ejemplo 1**.

3.2. Anticuerpos.

Se utilizó el anticuerpo anti-antígeno M2 de la gripe, obtenido de conejos inmunizados con la proteína M2 de la gripe unida a 10 restos de histidina, expresada en baculovirus y más tarde purificada, a una dilución 1:50. Se generó en el laboratorio de los inventores. Los protocolos de inmunofluorescencia fueron los mismos que lo explicado para el **Ejemplo 1**.

En conclusión, el **Ejemplo 3** muestra que el péptido de suministro fusionado al antígeno M2 de la gripe mostró las mismas propiedades dinámicas que el péptido solo o que la proteína que transportaba rodamina (TAMRA). Tiene la misma distribución intracelular extendida y las mismas propiedades de acumulación intracelular (**Fig. 6a**). Los inventores fueron capaces de detectar el antígeno M2 de la gripe con un anticuerpo específico que colocaliza con el péptido de suministro, lo que demuestra que se transportó mediante el péptido a los emplazamientos celulares (**Fig. 6b**). Esto demuestra que la carga a transportar de forma satisfactoria pueden ser péptidos, proteínas y/o antígenos, entre otros.

10 **Ejemplo 4. Suministro en ratones *in vivo* del antígeno M2 del virus de la gripe unido a la secuencia de péptido transportador (DynPro)**

Los materiales y métodos son coincidentes con el **Ejemplo 1**, excepto en los siguientes puntos.

15 Se inocularon por vía intraperitoneal 30 ratones hembra BALB/c (subgrupo AnNHsd) de 6-8 semanas de edad, con un volumen de 100 µl de las distintas formulaciones, según se explica a continuación, en los días 0, 14 y 28 posinoculación, y para analizar los sueros se les extrajo sangre en los días 0, 14, 28, 42 y 63.

20 Los inventores compararon el efecto del antígeno M2 del virus de la gripe solo y/o unido con el péptido de suministro o el péptido de suministro solo, inoculando 30 ratones en 5 grupos y comparando la respuesta inmunitaria. Además, se añadió el adyuvante incompleto de Freund en las formulaciones indicadas (**Fig. 6c-e**). Se probaron distintas combinaciones mediante la inoculación intraperitoneal de 2 µg de péptido/ratones/dosis como se indica a continuación:

- 25 GRUPO A (6 ratones): Péptido de suministro DynPro en PBS + adyuvante incompleto de Freund
- GRUPO B (6 ratones): Antígeno M2 de la gripe en PBS + adyuvante incompleto de Freund
- GRUPO C (6 ratones): Antígeno M2 de la gripe unido al péptido de suministro DynPro en PBS + adyuvante incompleto de Freund
- 30 GRUPO D (6 ratones): Antígeno M2 de la gripe unido al péptido de suministro DynPro en PBS

4.1. Determinación de anticuerpos específicos.

Mediante ELISA se evaluó la respuesta de IgG específica para M2 de la gripe. Para recubrir las microplacas de ELISA (Polysorp, Nunc, Dinamarca) se utilizó péptido M2 purificado (GL Biochem) en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, durante una noche a 4 °C, a una concentración de 500 ng/pocillo. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS-Tween 20 (PBST al 0,1 %) y se incubaron con solución de bloqueo (PBST-BSA al 2 %, 100 µl/pocillo) durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. Se incubaron diluciones con factor dos de las muestras de suero de 1:50 a 1:12.800 en tampón de bloqueo, durante 1 hora a 37 °C con agitación. Después, las placas se lavaron otra vez 4 veces con PBST y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Gelifesciences, Estados Unidos), diluido 1:2.000 en solución de bloqueo. Para la reacción con el sustrato, las placas se lavaron cuatro veces con PBST y se añadieron a las placas 100 µl/pocillo de ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) 1 mM (ABTS, KPL, Estados Unidos). Para desarrollar los inmunocomplejos se dejó reaccionar durante 15 min la reacción de peroxidasa a temperatura ambiente y las placas se leyeron a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Electron Corp, Estados Unidos).

45 El umbral límite que discriminaba entre sueros negativos y positivos se estableció en 2 veces la media de la DO405 de tres sueros de control negativo incluidos en cada ensayo (**Fig. 6c-e**).

En conclusión, el **Ejemplo 4** muestra la inoculación de ratones con el antígeno M2 de la gripe solo o unido al péptido de suministro, para comparar la respuesta inmunitaria producida. Todos los ratones permanecieron sanos, estables en peso y temperatura, sin signos de toxicidad. Se analizaron los sueros obtenidos de los ratones para ensayar la respuesta de anticuerpos. La primera inoculación mostró una fuerte respuesta de anticuerpos en los ratones inoculados con el antígeno M2 de la gripe con el adyuvante Incompleto de Freund y una respuesta inicial más baja en los inoculados con el antígeno M2 de la gripe unido al péptido de suministro (**Fig. 6c**). Después de una segunda inoculación, la respuesta de los anticuerpos se elevó de forma similar con o sin el péptido de suministro, siendo la prueba de que este método es adecuado para la vacunación (**Fig. 6d-e**).

Ejemplo 5. Suministro de las nanopartículas funcionalizadas con la secuencia del péptido que transporta la dineína.

60 Los materiales y métodos de este ejemplo son coincidentes con el **Ejemplo 1**, añadiendo los siguientes puntos:

5.1.1. Productos químicos para la síntesis de nanopartículas.

65 Todos los productos químicos eran de calidad reactiva y se utilizaron sin purificación adicional. El tetracloruroaureato (III) de hidrógeno trihidratado (al 99,9+ %), el clorhidrato de (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida y el ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (al 99,5 %) se compraron a Sigma-Aldrich, la N-(2-mercaptopropionil)glicina (>98 %) y

la *N*-hidroxisulfosuccinimida (>97 %) a Fluka, NaBH₄ (98 %) a Lancaster, las secuencias de péptido procedentes de la proteína p54 del VFPA (M2-DynPro, DynPro y el péptido de control INTCT3) a Genecust, CH₃O-PEG-NH₂ (750 Da) a Rapp-Polymere. El agua destilada en el laboratorio se purificó adicionalmente utilizando un sistema de agua de calidad reactiva Milli-Q (Millipore). Los tampones se prepararon de acuerdo con el procedimiento de laboratorio convencional. Otros productos químicos eran de calidad reactiva y se utilizaron como se recibieron.

MÉTODOS

5.2.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas.

Procedimientos generales. Los espectros UV-vis se llevaron a cabo con el espectrofotómetro Varian Cary 50. Los espectros de fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrómetro de fluorescencia LS-55. Las mediciones del potencial Zeta (ζ en mV) se realizaron utilizando un analizador ZetaPALS de Brookhaven. Todos los espectros se recolectaron en MES 50 mM, pH 6,5. Para los exámenes por MET, se colocó una única gota (10 μ l) de la solución acuosa (0,1 mg·ml⁻¹) de las nanopartículas de oro sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono. La rejilla se dejó secar al aire durante varias horas a temperatura ambiente. El análisis por MET se llevó a cabo en un microscopio FEI Tecnai 20 operado a 200 KV. La distribución del tamaño de partículas de las nanopartículas de Au se evaluó a partir de varias micrografías, utilizando un programa para el procesamiento y el análisis de imágenes (ImageJ). El número de partículas seleccionado para la estimación fue de alrededor de 400, lo que dio como resultado una estadística de distribución de tamaño estable.

Producción de Au@tiopronina: Se codisolvió tetracloroaurato (III) de hidrógeno trihidratado (0,15 g, 0,4 mmol, 1 equiv) y *N*-(2-mercaptopropionil) glicina (tiopronina; 0,19 g, 1,2 mmol, 3 equiv) en 20 ml de metanol/ácido acético 6:1, proporcionando una solución rojo rubí. Se añadió NaBH₄ (0,30 g, 8,0 mmol, 20 equiv) en 7,5 ml de H₂O con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 30 min adicionales después del enfriamiento y, después, el disolvente se retiró al vacío a 40 °C. La Au@tiopronina cruda era completamente insoluble en metanol pero bastante soluble en agua. Se purificó mediante diálisis, en la que el pH de 130 mg de producto crudo disuelto en 20 ml de agua se ajustó a 1 mediante la adición gota a gota de HCl concentrado. Esta solución se cargó en segmentos de 15 cm de membrana de diálisis de éster de celulosa sin fisuras (Sigma, LPM de 10 kDa) colocados en vasos de precipitado de agua de 4 l y se agitaron de forma lenta, recargando con agua fresca aproximadamente cada 10 h en el transcurso de 72 h. Las soluciones de Au@tiopronina azul oscuras se recolectaron a partir de los tubos de diálisis y se liofilizaron. Rendimiento: 96 mg. Diámetro promedio: 2,8 nm. UV/vis (H₂O) λ = 450, 560 nm (banda de plasmón superficial). Potencial Z, ζ (mV) = -28,00.

La unión del péptido a las nanopartículas (Au@#péptido#): se añadió clorhidrato de (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC; 2 mg, 0,01 mmol) y *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS; 3 mg, 0,014 mmol) a 4 ml de Au@tiopronina (2 mg) en ácido 2-[*N*-morfolino] etanosulfónico (MES) (50 mM, pH 6,5). Se añadió el péptido DynPro TAMRA (0,138 μ mol) o péptido M2-DynPro TAMRA (0,130 μ mol) o péptido INTCT3 TAMRA (0,138 μ mol) o TAMRA (0,036 μ mol), y la mezcla se agitó durante la noche. Después, esta solución se cargó en filtros centrífugos (Amicon Ultra-0,5 ml) para la purificación del péptido no acoplado DynPro o TAMRA y el exceso de EDC/sulfo NHS. UV/vis (H₂O) λ = 450, 560 nm (banda de plasmón superficial). Potencial Z ζ (DynProTAMRA) = -14,95 $\pm$ 7,85 mV; ζ (M2-DynProTAMRA) = -18,62 $\pm$ 4,01 mV y ζ (INTCT3TAMRA) = -36,32 $\pm$ 3,98 mV; ζ (TAMRA) = -3,46 $\pm$ 1,96 mV; Esquema de la estructura de la nanopartícula (Fig. 7a).

Preparación de las nanopartículas de Au@tiopronina: Las nanopartículas de Au@tiopronina se prepararon utilizando el procedimiento de Murray *et al.* (Templeton). La reacción se ejecutó en una mezcla metanólica/ácido acético. La codisolución de HAuCl₃ y tiopronina proporcionó una solución rojo rubí estable. La adición del reductor NaBH₄ proporcionó una solución marrón oscura. La funcionalización de las nanopartículas con el #péptido# y CH₃O-PEG-NH₂ se llevó a cabo utilizando el siguiente procedimiento. La suspensión se agitó durante aproximadamente 30 min y, después se eliminó el disolvente. Las nanopartículas se purificaron mediante diálisis y se caracterizaron por UV/vis y MET. Para el núcleo de oro de las nanopartículas se encontró un diámetro medio de 2,8 nm. Como consecuencia del pequeño tamaño de los grupos el espectro de absorción UV/vis mostró una banda de plasmón superficial (banda de PS) indetectable. La fluorescencia y los espectros de MS confirmaron la presencia en las nanopartículas del péptido marcado con TAMRA. La funcionalización de Au@tiopronina con la secuencia de péptido (DynPro) se llevó a cabo utilizando la reactividad del grupo carboxilo libre de la tiopronina (Esquema de la Fig. 7a). La reacción utiliza el carbodiimida EDC soluble en agua para catalizar reacciones entre los grupos ácidos de la nanopartícula y cualquiera de los grupos amino del péptido. Los inventores incluyeron sulfo NHS en la mezcla de reacción para mejorar la eficacia de la reacción de formación de la amida mediada por carbodiimida, mediante la producción de intermediarios éster activos de reacción resistentes a la hidrólisis. Las nanopartículas resultantes se analizaron por UV/vis, fluorescencia y espectroscopia de masas (MS), así como análisis del potencial Zeta y MET; después del acoplamiento del péptido no se observó agregación.

5.2.2 Incubación de las nanopartículas en las células

Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones estériles y seguras, trabajando con cabinas de seguridad de microbiológica de clase II. Las nanopartículas se resuspendieron en H₂O, con un grado de pureza mQ y estéril, para obtener soluciones madre a distintas concentraciones. Se puso especial atención para evitar la turbidez en la solución y las puntas siempre se utilizaron con un filtro para evitar posibles contaminaciones cruzadas. Se almacenaron a 4 °C alícuotas de 500 µl a hasta el momento de uso. Las soluciones de trabajo de las nanopartículas se prepararon a partir de las soluciones madre en medio de DMEM SC (PS al 1 %, G al 1 %) y se ajustaron a 8 µM, que era la concentración óptima. Este procedimiento se realizó justo antes de añadir las nanopartículas al cultivo celular, para evitar la degradación. Para realizar los ensayos *in vivo*, se cultivaron durante una noche 10⁶ células Vero en placas de vidrio de 35 mm. Las células se lavaron en DMEM SC (PS al 1 %, G al 1 %), y el medio presente se reemplazó por 300 ml de las soluciones que contenían las nanopartículas a la concentración óptima. Las nanopartículas se incubaron a 8 mM en cámaras de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, y se observaron con el microscopio confocal. Para observar distintas fases de la acumulación en las células los periodos de tiempo de incubación variaron de 1 minuto a 3 horas.

5.3.1 Análisis de citotoxicidad. Ensayos de viabilidad y proliferación celulares.

Para evaluar la viabilidad celular, se incubaron células Vero sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM que contenía nanopartículas de Au-tiopronina funcionalizadas con los péptidos de suministro DynPro, DynPro-M2 o el INTCT3 de control negativo, unidos a las nanopartículas a concentraciones que variaban de 0 a 50 µM. Después de la incubación con los péptidos durante 24 h, las células se recogieron y se determinó el número de células viables presentes en las suspensiones celulares mediante ensayo de exclusión del colorante azul de Tripán (Sigma) (**Fig. 7d**). Brevemente, se añadieron 20 µl de PBS con azul de Tripán al 0,08 % a un volumen equivalente de suspensión celular y se mezcló. Después de 2 minutos, las células azules (células muertas) se contaron utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico convencional.

Para evaluar la proliferación celular, 3x10⁴ células Vero sembradas en placas de 96 pocillos se incubaron en 50 µl de DMEM que contenía los péptidos de suministro DynPro o INTCT3 de control negativo, unidos a las nanopartículas a concentraciones que variaban de 0 a 50 µM. Después de 36 h de incubación, se determinó la proliferación celular utilizando el ensayo CellTiter 96 Aqueous™ (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante (**Fig. 7e**).

En conclusión, el **Ejemplo 5** muestra que el péptido de suministro de unión a dineína puede unirse a distintos fármacos y productos químicos, tanto orgánicos (proteína rodamina) como inorgánicos (metal Au), para formar nanopartículas funcionalizadas con los péptidos de suministro. Estas nanopartículas no muestran ninguna toxicidad o efecto proliferativo en las células. Estas nanopartículas pueden adicionalmente unirse a fármacos o productos farmacéuticos (tal como la tiopronina utilizada en enfermedades renales), a otros péptidos o antígenos (tal como el péptido M2 de la gripe) y otros, como indica el estado de la técnica. Ellos conservan las capacidades de distribución, acumulación intracelular y difusión intercelular de los péptidos de suministro de unión a dineína y su capacidad de entrar a través de la membrana nuclear o de una célula a otra, independientemente de su tamaño.

Ejemplo 6. Efecto antiviral de los péptidos fusionados a nanopartículas.

Las nanopartículas estabilizan los péptidos que van a ser suministrados, para tratamientos antivirales y para mejorar la biodisponibilidad y otras propiedades farmacológicas de los péptidos para ser usados en tratamientos antivirales *in vivo*. En este ejemplo, los inventores demuestran el efecto antiviral del péptido DynPro y el control INTCT3 fusionados a las nanopartículas de oro-tiopronina del **Ejemplo 5**. Los materiales y métodos de este ejemplo son coincidentes con el **Ejemplo 1**, añadiendo los siguientes puntos:

6.1.1. Aislados víricos utilizados.

El aislado del virus de la fiebre porcina africana utilizado en las pruebas de inhibición de la infección fue BA71 V, adaptado para crecer en la línea celular Vero. La reserva vírica se conservó en alícuotas de 100 µl a - 80 °C en medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 15 %. En el momento de su uso, las alícuotas necesarias se descongelaron de forma rápida en un baño a 37 °C y se mantuvieron en hielo.

6.1.2. Anticuerpos y cromógenos utilizados.

- anticuerpo monoclonal anti-p30: desarrollado en el laboratorio del Dr. José Ángel Martínez Escribano, reconoce de forma específica y detecta la proteína temprana p30 del VFPA.
- anticuerpo monoclonal anti-p72 (anti-p73): comercializado por Ingenasa, reconoce de forma específica y detecta la proteína estructura tardía, principalmente p72 o p73, del VFPA.
- anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (Molecular Probes).

- anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes).
- anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa HRP (GE Healthcare).
- anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa HRP (GE Healthcare).

5 6.2.1 Efecto antiviral del péptido unido a las nanopartículas.

La noche antiviral al experimento se cultivaron 9×10^4 células Vero en placas de 24 pocillos. La mañana siguiente, las células se lavaron en DMEM SC y el medio presente se reemplazó con 300 μ l de las soluciones que contenían los distintos péptidos unidos a las nanopartículas a distintas concentraciones. La incubación de las células con los péptidos unidos a las nanopartículas tuvo lugar durante 1 hora a 37 °C y CO₂ al 5 %, después de lo cual las células se infectaron con el VFPA. Para infectar las células, el cultivo celular existente se retiró y se reemplazó hasta 350 μ l al 2 %/pocillo, que contenían la cantidad correspondiente para obtener una multiplicidad de infección de 1 unidad formadora de placas (ufp) por célula. La infección se dejó transcurrir durante el tiempo deseado a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Después del periodo de absorción (2 h a 37 °C), el virus residual se retiró lavando dos veces con DMEM SC y para finalizar, las células se dejaron en 300 μ l de DMEM SC recién preparado que contenía la concentración de péptidos correspondiente. Se dejó transcurrir la infección a 37 °C durante el tiempo deseado en cada experimento, dependiendo del parámetro de la infección a analizar.

20 6.2.2 Detección de las células infectadas por VFPA mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La detección de las células infectadas por VFPA en células expuestas previamente a los péptidos unidos a las nanopartículas se realizó 6 horas posinfección. Las técnicas de IFI utilizadas para detectar las células infectadas con VFPA mediante inmunofluorescencia fueron las convencionales. En resumen, las células se lavaron con 1 ml de PBS antes de fijarlas con una solución de PBS-paraformaldehído al 3,8 %, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, el paraformaldehído residual se eliminó lavando 3 veces las células con 1 ml de PBS. La permeabilización de las membranas celulares se realizó utilizando PBS-Triton X-100 al 0,2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de otros 3 lavados con PBS, las células se incubaron a 37 °C en solución de bloqueo (PBS-BSA al 3 %) durante 45 minutos. Como antígeno vírico a detectar se eligió la proteína temprana p30 [5] del VFPA y su detección se llevó a cabo utilizando el anticuerpo anti-p30 diluido 1:200 en PBS durante 1 hora a 37 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución con anticuerpo anti-IgG de ratón diluido 1:300 en PBS. Las células se lavaron en PBS y para finalizar se incorporó un marcaje de núcleo con Hoechst 3332. Para finalizar, los cubreobjetos que contenían las células se montaron sobre portaobjetos utilizando Prolong como medio de montaje. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia convencional (Leica) para contar el número de células positivas para el antígeno vírico p30.

40 6.2.3. Evaluación del efecto antiviral de las nanopartículas unidas al péptido mediante análisis de la síntesis de proteínas víricas FPA mediante western blot.

Las proteínas víricas sometidas a análisis fueron la proteína p30 temprana del VFPA, expresada durante las fases iniciales de la infección, y la proteína p72 (también llamada p73) expresada durante la fase tardía de la infección. Se llevó a cabo el western blot sobre las células, las cuales se lavaron con 1 ml de PBS frío, antes de recogerlas en 50 μ l de tampón de extracción de proteínas RIPA helado (NaCl 150 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, NP40 al 1 %, SDS al 1 % y Tris-HCl 50 mM pH = 8). Para solubilizar las proteínas se incubaron a 4 °C con agitación orbital durante 20 minutos y después se centrifugaron a 12.000 rpm en una centrífuga de mesa a 4 °C durante 10 minutos. Los precipitados se descartaron y se recolectaron los sobrenadantes, los cuales se almacenaron a -70 °C hasta su análisis mediante transferencia de western.

Las muestras se descongelaron en hielo y se cuantificó la cantidad de proteína en las distintas muestras mediante el método de Bradford. Se separaron 20 μ g de proteína total desnaturalizada a 100 °C durante 5 minutos, mediante electroforesis en geles de acrilamida:bis-acrilamida al 15 %, durante 90 minutos a 100 V constantes. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a 100 V constantes en presencia de un tampón de transferencia (Tris-glicina, metanol al 20 %). La membrana se bloqueó en presencia de PBS-leche en polvo desnatada al 5 % a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora con agitación orbital. Después, la membrana se hibridó con 10 ml de anticuerpo policlonal anti-DLC8 diluido 1:50 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después de este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con 20 ml de PBS-Tween al 0,05 %, a temperatura ambiente durante 15 minutos cada una. La incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa y diluido 1:4000 en PBS duró 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después, las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween al 0,005 % durante 15 minutos cada una. Para finalizar, se realizó la detección mediante quimioluminiscencia utilizando ECL siguiendo las instrucciones del fabricante de manera convencional.

65 Como muestra de partida para el análisis, se utilizaron extractos de proteínas solubles totales procedentes de

células Vero expuestas o no a las distintas nanopartículas unidas a péptidos y más tarde infectadas o no con VFPA durante 16 horas.

Como anticuerpos primarios, se utilizaron en membranas independientes el anticuerpo monoclonal anti-p30 diluido 1:100 en PBS y el anticuerpo monoclonal anti-p72 diluido 1:2000 en PBS. Las membranas se incubaron con ambos anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Como anticuerpo secundario, se utilizó en ambos casos anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Para finalizar, se realizó densitometría de la reacción de quimioluminiscencia para cuantificar y relativizar la cantidad de proteína existente en cada banda detectada.

En conclusión, el **Ejemplo 6** muestra que las nanopartículas funcionalizadas para suministrar péptidos son útiles como agentes antivirales y que sus propiedades farmacológicas, como la vida media prolongada, las hace especialmente adecuadas para cualquier composición farmacéutica.

Ejemplo 7. Construcción de nanopartículas de Au-tiopronina accionadas por motor molecular pegiladas nuevas para aumentar las propiedades de estabilidad de la nanopartícula y la vida media *in vivo*.

Los materiales y métodos son coincidentes con el **Ejemplo 5** precedente, con los siguientes cambios específicos en la síntesis y preparación de las nanopartículas:

7.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas pegiladas.

Preparación de Au@péptido/PEG: Se añadió clorhidrato de (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC; 2 mg, 0,01 mmol) y *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS; 3 mg, 0,014 mmol) a 4 ml de Au@tiopronina (2 mg) en ácido 2-[*N*-morfolino] etanosulfónico (MES) (50 mM, pH 6,5). Después, se añadió el péptido DynPro (0,138 μ mol) o el péptido M2-DynPro (0,130 μ mol) o el péptido INTCT3 (0,138 μ mol) o TAMRA (0,036 μ mol), y se agitó durante 20 minutos; después de este tiempo para el acoplamiento del péptido a las partículas, se añadió a las soluciones CH₃O-PEG-NH₂ (0,525 mg, 700 nmol) y se dejó en agitación durante una noche. Las distintas preparaciones se cargaron en filtros centrífugos (Amicon Ultra-0,5 ml) para la purificación de los péptidos no acoplados o TAMRA, CH₃O-PEG-NH₂ y el exceso de EDC/sulfo NHS. UV/vis (H₂O) λ = 450, 560 nm (banda de plasmón superficial). Potencial ζ (DynProTAMRA/PEG)= -1,60 $\pm$ 1,21 mV; ζ (M2DynProTAMRA/PEG)= -18,13 $\pm$ 5,85 mV y ζ (INTCT3TAMRA/PEG)= -30,33 $\pm$ 5,53 mV; ζ (TAMRA/PEG)= -0,03 $\pm$ 0,03 mV. Esquema de la composición de la nanopartícula (**Fig. 7a**).

La adición sobre el cultivo celular y la evaluación se realizó como en el **Ejemplo 5**.

En conclusión, el **Ejemplo 7** muestra que las nanopartículas funcionalizadas con el péptido de suministro se pueden unir a distintas cargas tales como polímeros, siendo las cadenas poliméricas de polietilenglicol (PEG) un ejemplo característico con muchas aplicaciones en productos farmacéuticos y medicina. Estas nanopartículas conservan las capacidades de distribución, acumulación intracelular y difusión intercelular de los péptidos de unión a dineína de suministro y su capacidad de entrar a través de la membrana nuclear o de una célula a otra, independientemente de su tamaño.

Ejemplo 8. Construcción de nanopartículas de Au-Tiopronina-carbohidratos accionadas por motor molecular nuevas para suministrar el péptido TERT^h o ACE para diagnóstico, terapia o vacunación antineoplásica.

Los materiales y métodos son coincidentes con el **Ejemplo 5** precedente, con los siguientes cambios específicos en la síntesis y preparación de las nanopartículas:

Las secuencias del péptido TERT^h y/o ACE se unieron a las nanopartículas de Au-Tiopronina funcionalizadas con el péptido de unión a dineína DynPro. La adición sobre el cultivo celular y la evaluación fue la misma que en el **Ejemplo 5** pero, además, esta formulación se probó en líneas celulares de origen tumoral. Se estudiaron varias líneas celulares procedentes de los tumores humanos más comunes, incluyendo las células HeLa (de carcinoma de cuello uterino que portaba virus del papiloma humano, con p53 de tipo silvestre pero inactivada), la línea celular SK-N-MC de células de neuroblastoma humano, las líneas celulares de linfocitos humanos CARPAS 446 procedentes de células de linfoma no Hodgkin, las células A431 (carcinoma epidermoide; p53 mutada), las células HT29 (adenocarcinoma de colon; p53 mutada), las células MCF7 (adenocarcinoma de mama; p53 de tipo silvestre), las células Saos-2 (osteosarcoma; ausencia de p53) y tres líneas celulares de melanoma maligno uveal: MKTBr (p53 mutada), OCM1 (p53 mutada) y Sp6 (p53 de tipo silvestre).

La viabilidad celular se evaluó después del tratamiento con las nanopartículas. Se sembraron en placa un total de 4 X 10⁴ células/pocillo en placas de cultivo de 24 multipocillos; la densidad celular se evaluó mediante el método de cristal violeta. Brevemente, las células se fijaron con glutaraldehído al 1 % durante 10 minutos, se lavaron dos veces en PBS y se tiñeron con 1,5 ml de solución de cristal violeta al 0,1 % durante 30 minutos. Las células se aclararon en un vaso de precipitado con una corriente suave de agua destilada hasta que el colorante se lavó y se dejaron

secar durante una noche. La absorbancia se leyó a 590 nm por la captación de colorante en ácido acético al 10 %.

En conclusión, el **Ejemplo 8** muestra que las nanopartículas funcionalizadas con el péptido de suministro que transportaban los péptidos tumorales (ACE, TERT^h) son útiles como sistema de suministro en células tumorales, con uso potencial en diagnóstico y vacunación antineoplásica.

Ejemplo 9. Construcción de nanopartículas de Au-Tiopronina accionadas por motor molecular que transportan un péptido antitumoral inhibidor de TERT^h.

Los materiales y métodos son coincidentes con el Ejemplo 5 precedente, con los siguientes cambios específicos en la síntesis y preparación de las nanopartículas:

La adición sobre el cultivo celular y la evaluación fueron las mismas que en el **Ejemplo 5** pero, además, esta formulación se probó en líneas celulares de origen tumoral. Se estudiaron varias líneas celulares procedentes de los tumores humanos más comunes, incluyendo las células HeLa (procedentes de carcinoma de cuello uterino que portaba virus del papiloma humano, con p53 del tipo silvestre pero inactivada), las células A431 (carcinoma epidermoide; p53 mutada), las células HT29 (adenocarcinoma de colon; p53 mutada), las células MCF7 (adenocarcinoma de mama; p53 del tipo silvestre), la línea celular SK-N-MC de células de neuroblastoma humano, la línea celular de linfocitos humanos CARPAS 446 procedente de células de linfoma no Hodgkin y las células Saos-2 (osteosarcoma; ausencia de p53).

La viabilidad celular se evaluó después del tratamiento con las nanopartículas. Se sembraron en placa un total de 4×10^4 células por pocillo en placas de cultivo de 24 multipocillos. La densidad celular se evaluó mediante el método de cristal violeta. Brevemente, las células se fijaron con glutaraldehído al 1 % durante 10 minutos, se lavaron dos veces en PBS y se tiñeron con 1,5 ml de solución de cristal violeta al 0,1 % durante 30 minutos. Los pocillos se aclararon en un vaso de precipitados con una corriente suave de agua destilada hasta que se lavó el colorante y se dejaron secar durante una noche. La absorbancia se leyó a 590 nm mediante captación del colorante en ácido acético al 10 %.

En conclusión, el **Ejemplo 9** muestra que las nanopartículas funcionalizadas con el péptido de suministro que transportaba el péptido anti-TERT eran citotóxicas en células de origen tumoral, siendo la base para un nuevo sistema de suministro de agentes para terapia para el cáncer.

Ejemplo 10. Distribución subcelular de una formulación de péptido que comprende la SEQ ID NO: 11 (TransMy).

Los materiales y métodos de este ejemplo son coincidentes con el **Ejemplo 1**, con excepción de los siguientes puntos:

10.1 Péptido utilizado:

Se utilizó un péptido con la SEQ ID NO: 11 (TransMy) unido a una cola de octa-arginina. El péptido INTCT3 se utilizó como control. Ambos péptidos se unieron a la proteína tetrametil-rodamina (TAMRA) y se describen en la **Tabla 1**.

La fuente, la manipulación de los péptidos y otros métodos fueron los mismos que los descritos en el **Ejemplo 1**.

La **Fig. 8** muestra la acumulación intracelular eficaz de dichos péptidos y su distribución intra e intercelular. Muestra su localización por todo el citosol y, lo que es de la mayor importancia, también en el núcleo.

Ejemplo 11. Construcción del péptido TransMy de la SEQ ID NO: 11 funcionalizado con nanopartículas de Au-Tiopronina PEGiladas para suministrar una vacuna de ADN que codifica los antígenos HA1 (hemaglutinina) y M2 del virus de la gripe

Los materiales y métodos son coincidentes con el **Ejemplo 5** precedente, con los siguientes cambios específicos en la síntesis y preparación de las nanopartículas:

11.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas pegiladas: Au@p3k-TransMy

Preparación de Au@péptido/PEG: se añadió clorhidrato de (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC; 2 mg, 0,01 mmol) y *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS; 3 mg, 0,014 mmol) a 4 ml de Au@tiopronina (2 mg) en ácido 2-[*N*-morfolino] etanosulfónico (MES) (50 mM, pH 6,5). Después, se añadió el péptido TransMy (0,138 μ mol) o el péptido INTCT3 (0,138 μ mol) o TAMRA solo (0,036 μ mol) y se agitó durante 20 minutos; después de este tiempo para el acoplamiento del péptido a las nanopartículas, se añadió CH₃O-PEG-NH₂ (0,525 mg, 700 nmol) a las soluciones y se dejó en agitación durante la noche. Las distintas preparaciones se cargaron en filtros centrífugos (Amicon Ultra-0,5 ml) para la purificación de los péptidos no acoplados o de TAMRA, CH₃O-PEG-NH₂ y el exceso de EDC/sulfo NHS. UV/vis (H₂O) λ = 450, 560 nm (banda de plasmón superficial). Potencial Z ζ

(TransMyTAMRA/PEG)= $-1,59 \pm 1,22$ mV; ζ (INTCT3TAMRA/PEG)= $-30,33 \pm 5,53$ mV y ζ (TAMRA/PEG)= $-0,03 \pm 0,03$ mV.

Incorporación de plásmido: Como ejemplo, se incorporó una composición de vacuna de ADN que comprende un plásmido pcDNAs que codifica la hemaglutinina HA1 de la gripe (pcAPCH-Lk1-HA1) y/o el casete de expresión de la proteína M2 (pcAPCH-Lk1-4M2) en las nanopartículas Au@p3k-TransMy a una proporción de 0,1 mg de plásmido/mg de nanopartícula, con el fin del suministro y la expresión de proteína. La adición sobre el cultivo celular y la evaluación se realizaron tal como se muestra para el **Ejemplo 5**.

En conclusión, el **Ejemplo 11** muestra que las nanopartículas funcionalizadas con el péptido de suministro se pueden unir a distintas cargas tales como polímeros, siendo las cadenas poliméricas del polietilenglicol (PEG), un ejemplo característico con muchas aplicaciones en productos farmacéuticos y en medicina. Estas nanopartículas conservan las capacidades de distribución, acumulación intracelular y difusión intercelular de las otras formulaciones de péptidos de suministro de unión a dineína, y su capacidad para entrar a través de la membrana celular o de una célula a otra, independientemente de su tamaño, tal como se muestra en la **Figura 8B**.

Además, se detectó en las células la expresión satisfactoria de cada vector plasmídico o vacuna de ADN utilizando inmunofluorescencia, con un anticuerpo frente a la hemaglutinina de la gripe (anti-HA; **Figura 8E**) y frente a M2 de la gripe (anticuerpo anti-M2; **Figura 8F**).

Referencias

- Bao L, Guo H, Huang X, Tammana S, Wong M, McIvor RS, Zhou X. High-titer lentiviral vectors stimulate fetal calf serum-specific human CD4 T-cell responses: implications in human gene therapy. *Gene Ther* 16:788-95, 2009
- Bareford, L. M. y Swaan, P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 748-758, 2007.
- Branden L.J., A.J. Mohamed, C.I.E. Smith. A peptide nucleic acid nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat. Biotechnol.* 17: 784-787, 1999
- Ciolina C., G. Byk, F. Blanche, V. Thuillier, D. Scherman, P. Wils, Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin, *Bioconjug.Chem.* 10 49-55, 1999
- Dujardin D.L., L.E. Barnhart, S.A. Stehman, E.R. Gomes, G.G. Gundersen y Richard B. Vallee. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *The Journal of Cell Biology* 163, Number 6: 1205- 1211, 2003
- Futaki S., Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 547- 558, 2005
- Hambley, T.W. y W.N. Hait. Is anticancer drug development heading in the right direction? *Cancer Res.* 69:1259-1262, 2009
- Howard, M. D., Jay, M., Dziublat, T. D. y Lu, X. L. PEGylation of nanocarrier drug delivery systems: state of the art. *J. Biomed. Nanotechnol.* 4, 133-148, 2008
- Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.* 11: 404-10, 2010
- Iyer, A.K., G. Khaled, J. Fang y H. Maeda. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today.* 11:812-818, 2006
- Liao C, Zhao MJ, Zhao J, *et al.* Overexpression of LPTS-L in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 induces crisis. *World J Gastroenterol* 2002; 8:1 050-1052
- Melo S.A., C. Moutinho, S. Ropero, G.A. Calin, S. Rossi, R. Spizzo, A.F. Fernandez, V. Davalos, A. Villanueva, G. Montoya, H. Yamamoto, S. Schwartz y M. Esteller. A Genetic Defect in Exportin-5 Traps PrecursorMicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells. *Cancer Cell* 18, 303-315, 2010.
- Moffatt S, Hays J, HogenEsch H, Mittal SK. Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: implications in gene therapy. *Virology* 272: 159-167, 2000
- Pante, N. y Kann, M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of similar to 39

nm. Mol. Biol. Cell 13, 425-434, 2002.

- Rothbard J.B., T.C. Jessop, R.S. Lewis, B.A. Murray, P.A. Wender. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells, J. Am. Chem. Soc. 126: 9506-9507, 2004
- Salina D., K. Bodoor, D. Mark Eckley, T.A. Schroer, J.B. Rattner y B. Burke. Cytoplasmic Dynein as a Facilitator of Nuclear Envelope Breakdown. Cell 108, 97-107, 2002
- Sandgren S., F. Cheng, M. Belting, Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell surface proteoglycans. J. Biol. Chem. 277: 38877-38883, 2002
- Sebestyen M.G., J.J. Ludtke, M.C. Bassik, G. Zhang, V. Budker, E.A. Lukhtanov, J.E. Hagstrom, J.A. Wolff. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA, Nat. Biotechnol. 16: 80-85, 1998
- Subramanian A., P. Ranganathan, S.L. Diamond, Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells, Nat. Biotechnol. 17: 873-877, 1999
- Sugahara, K.N., T. Teesalu, P.P. Karmali, V.R. Kotamraju, L. Agemy, O.M. Girard, D. Hanahan, R.F. Mattrey y E. Ruoslahti. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. Cancer Cell. 16:510-520, 2009
- Templeton, A. C.; Chen, S.; Gross, S. M.; Murray, R. W. Langmuir 1999, 15, 66-76.
- Wadia J.S., R.V. Stan, S.F. Dowdy, Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, Nat. Med. 10: 310-315, 2004
- Wagner, E. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 38: 279-289, 1999
- Wang G., X. Gao, Y. Huang, Z. Yao, Q. Shi y M. Wu. Nucleophosmin/B23 Inhibits Eg5-mediated Microtubule Depolymerization by Inactivating Its ATPase Activity. The Journal of Biological Chemistry Vol. 285: 19060-19067, 2010.
- Zaro J.L., W.C. Shen, Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides. Biochem. Biophys. Res. C 307: 241-247, 2003
- Zhou XZ y KP Lu. The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1Is a Potent Telomerase Inhibitor. Cell 107, 347-359, 2001.
- Ziegler A., P. Nervi, M. Duerrenberger, J. Seelig, The cationic cell-penetrating peptide CPPTAT derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence, Biochemistry 44: 138-148, 2005.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

<120> Péptidos transportadores para el suministro en células

<130> PCT-05222

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

ES 2 609 250 T3

<400> 1

Thr Ala Ser Gln Thr
1 5

5 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia artificial

<400> 2

Lys Ser Thr Gln Thr
1 5

15 <210> 3
<211> 5
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

25 <400> 3

Lys Asn Thr Met Thr
1 5

30 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia artificial

<400> 4

Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr
1 5

40 <210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia artificial

<400> 5

50

Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr
1 5 10

55 <210> 6
<211> 20
<212> PRT

ES 2 609 250 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 6

His Pro Ala Glu Pro Gly Ser Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser
1 5 10 15

Gln Thr Met Ser
20

10

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 7

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Ser Arg Ser Asn Gly Ser Ser Asp Pro His Pro Ala Glu Pro Gly Ser
20 25 30

Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser
35 40 45

20

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

30

<400> 8

Tyr Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser
1 5 10

35

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Secuencia artificial

<400> 9

ES 2 609 250 T3

His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser
1 5 10 15

Gln Thr Met Ser
20

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 10

Phe Pro Asn Pro Ser Gly Arg Ser Ser Glu Asp Lys Ser Thr Gln Thr
1 5 10 15

Ala Gly

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 11

Pro Lys Asp Asp Lys Asn Thr Met Thr Asp
1 5 10

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 12

Ser Leu Val Ser Ser Asp Glu Ser Val Leu His Gly Ser His Glu Ser
1 5 10 15

Gly Glu His Val
20

<210> 13
<211> 7345
<212> ADN
<213> secuencias artificiales

<220>
<223> /mol_type="ADN" /nota="pcAPCH1-Lk1-HA1" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 13

gacggatcgg gagatctccc gatcccttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgtt gagtagtgct	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggtagt gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatatc cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cggtacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgacgc cccaacgacc	360
cccgccatt gagctcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tattttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatatga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900
gtttaaacgg gcccgacgtc gcatgctccc ggccgccatg gacttcgggt tgagcttggt	960
tttccttgcc cttattttta aaggtgtcca gtgtgacgtg cagctggtgg agtctggggg	1020
agacttagtg cagcctggag ggtccctgaa actctctctg gcagtctctg gattcacttt	1080

ES 2 609 250 T3

cagtagctat ggcattgtctt ggggttcgcca gactccagac aagaggctgg aattgggtcgc 1140
 aaccattaat gagaatggag gtagcaccta ttatccagac agtgtgaggg gccgtttcac 1200
 catctccaga gacaatgcc agaaccacct gtacttgcaa atgagcagtc tgaagtctga 1260
 ggatacagcc atgtattact gtgcaaggga gacctccggt agaaggtact ggttttacct 1320
 cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca ggaggtggcg gatcaggagg 1380
 cggaggttct ggaggaggtg ggagtcaa atgttctctcc cagtctccag caatcatgtc 1440
 tgcatttcca ggggagaggg tcaccatgac ctgcagtgcc agctcaagt taagttatat 1500
 gttctggtac cagcagaagc caggatcctc cccagactc ctgatttatg acacatccaa 1560
 cctggcttct ggagtccctg ttcgcttcag tggcagtggg tctgggacct cttactctct 1620
 cacaatcagc cgaatggagg ctgaagatgc tgccactttt tactgccaac agtggttttc 1680
 ttacccaccg acgttcggtg gaggcaccaa ggtggagatc aaacgggagt ttcctaagcc 1740
 ctccacccct cctggttctt ccggtggcgc tctcgacgac acaatatgta taggctacca 1800
 tgcgaacaat tcaaccgaca ctgttgacac agtactcgag aagaatgtga cagtgcacac 1860
 ctctgttaac ctgctcgaag acagccacaa cggaaaacta tgtagattaa aaggaatagc 1920
 cccactacaa ttggggaaat gtaacatcgc cggatggctc ttgggaaacc cagaatgcga 1980
 cccactgctt ccagtgcgat catggctcta cattgtagaa acaccaaact ctgagaatgg 2040
 aatatgttat ccaggagatt tcatcgacta tgaggagctg agggagcaat tgagctcagt 2100
 gtcattcatc gaaagattcg aaatatttcc caaagaaagc tcatggccca accacaacac 2160
 aaacggagta acggcagcat gctcccatga ggggaaaagc agtttttaca gaaatttgct 2220
 atggctgacg gagaaggagg gctcataccc aaagctgaaa aattcttatg tgaacaaaaa 2280
 agggaaagaa gtccttgtag tgtggggtat tcatcaccgc cctaacagta aggaacaaca 2340
 gaatctctat cagaatgaaa atgcttatgt ctctgtagtg acttcaaatt ataacaggag 2400
 atttaccocg gaaatagcag aaagacccaa agtaagagat caagctggga ggatgaacta 2460
 ttactggacc ttgctaaaac ccggagacac aataatattt gaggcaaatg gaaatcta at 2520
 agcaccaatg tatgctttcg cactgagtag aggctttggg tccggcatca tcacctcaaa 2580
 cgcattcaat catgagtgtg acacgaagtg tcaaacaccc ctgggagcta taaacagcag 2640
 tctcccttac cagaatatac acccagtcac aataggagag tgcccaaat acgtcaggag 2700
 tgccaaattg aggatggtta caggactaag gaacattccg tccattcaat ccactagtgg 2760
 cagcggcagc ggcgaattcc gtttaaacca tcatcatcat catcatcatt aaccggggaa 2820
 tcgaattcaa aggcctacgt cgagcggcgc ccaactgtgt ggatatctgc agaattccac 2880
 cactactggac tagtggatcc gagctcggta ccaagcttaa gtttaaaccg ctgatcagcc 2940
 tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccg gccttccttg 3000

accctggaag	gtgccactcc	caactgtcctt	tcctaataaa	atgaggaaat	tgcatacgcat	3060
tgtctgagta	ggtgtcattc	tattctgggg	ggtgggggtgg	ggcaggacag	caagggggag	3120
gattgggaag	acaatagcag	gcatgctggg	gatgcgggtgg	gctctatggc	ttctgaggcg	3180
gaaagaacca	gctggggctc	taggggggtat	ccccacgcgc	cctgtagcgg	cgcattaagc	3240
gcggcgggtg	tgggtggttac	gogcagcgtg	accgctacac	ttgccagcgc	cctagcgccc	3300
gctcctttcg	ctttcttccc	ttcctttctc	gccacgttcg	ccggctttcc	ccgtcaagct	3360
ctaaatcggg	ggctcccttt	agggttccga	tttagtgctt	tacggcacct	cgaccccaaa	3420
aaacttgatt	aggggtgatg	ttcacgtagt	gggccatcgc	cctgatagac	ggtttttcgc	3480
cctttgacgt	tggagtccac	gttctttaat	agtggactct	tgttcctaac	tggacaacaa	3540
ctcaacccta	tctcgggtcta	ttcttttgat	ttataaggga	ttttgccgat	ttcggcctat	3600
tggttaaaaa	atgagctgat	ttaacaaaaa	tttaacgcga	attaattctg	tggaatgtgt	3660
gtcagttagg	gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	3720
atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	3780
tgcaaagcat	gcatactcaat	tagtcagcaa	ccatagtccc	gcccctaact	ccgcccatac	3840
cgcccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgcccc	tggctgacta	atttttttta	3900
tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctctgcct	ctgagctatt	ccagaagtag	tgaggaggct	3960
tttttgaggg	cctaggcttt	tgcaaaaagc	tcccgggagc	ttgtatatcc	attttcggat	4020
ctgatcaaga	gacaggatga	ggatcgtttc	gcatgattga	acaagatgga	ttgcacgcag	4080
gttctccggc	cgtttgggtg	gagaggctat	tccgctatga	ctgggcacaa	cagacaatcg	4140
gctgctctga	tgccgcctgt	ttccggctgt	cagcgcaggg	gcgcccgggt	ctttttgtca	4200
agaccgacct	gtccggtgcc	ctgaatgaac	tgcaggacga	ggcagcgcgg	ctatcgtggc	4260
tggccacgac	ggggttccct	tgcgcagctg	tgtctgacgt	tgtcactgaa	gcgggaaggg	4320
actggctgct	attgggcgaa	gtgccggggc	aggatctcct	gtcatctcac	cttgcctcctg	4380
ccgagaaagt	atccatcatg	gctgatgcaa	tgcggcggct	gcatacgctt	gatccggcta	4440
cctgccatt	cgaccaccaa	gcgaaacatc	gcatacgagc	agcacgtact	cggatggaag	4500
ccggtcttgt	cgatcaggat	gatctggacg	aagagcatca	ggggctcgcg	ccagccgaac	4560
tgttcgccag	gctcaaggcg	cgcatacccc	acggcgagga	tctcgtcgtg	acccatggcg	4620
atgcctgctt	gccgaatata	atggtggaaa	atggccgctt	ttctggattc	atcgactgtg	4680
gccggctggg	tgtggcggac	cgtatcagg	acatagcgtt	ggctaccctg	gatattgctg	4740
aagagcttgg	cggcgaatgg	gctgaccgct	tcctcgtgct	ttacgggtatc	gccgctcccc	4800
attcgcagcg	catcgccttc	tatcgccttc	ttgacgagtt	cttctgagcg	ggactctggg	4860

gttcgaaatg accgaccaag cgacgcccac cctgccatca cgagatttcg attccaccgc 4920
cgccttctat gaaagggttg gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct 4980
ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt cgcaccaccc aacttgttta ttgcagctta 5040
taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact 5100
gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc 5160
gacctctagc tagagcttg gtaaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta 5220
tccgctcaca attccacaca acatacagac cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc 5280
ctaagtgtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg 5340
aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcgggttgcg 5400
tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgtcgggtcg ttcggctgcg 5460
gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa 5520
cgcagaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc 5580
gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc 5640
aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag 5700
ctccctcgtg cgtctctcctg ttccgacctt gcgccttacc ggatacctgt ccgcctttct 5760
cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacagctgt aggtatctca gttcgggtga 5820
ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc 5880
cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagacttat cgcactggc 5940
agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt 6000
gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct 6060
gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc 6120
tggtagcggg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 6180
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtg aacgaaaact caggttaagg 6240
gattttgggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 6300
aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 6360
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 6420
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 6480
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 6540
aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 6600
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 6660
tgctacaggc atcgtggtgt cagctcgtc gtttggtatg gcttcattca gtcocggttc 6720
ccaacgatca aggcaggtta catgatcccc catgttggtg aaaaaagcgg ttagctcctt 6780

cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc	6840
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga	6900
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc	6960
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa	7020
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta	7080
acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg	7140
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg	7200
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat	7260
gagcgggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt	7320
tccccgaaaa gtgccacctg acgtc	7345

<210> 14

<211> 6600

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<223> /mol_type="ADN" /nota="pcAPCH1-Lk1-4M2" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 14

gacgggatcgg gagatctccc gatccoctat ggtgcactct cagtacaatc tgcctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgtccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttaggggttag gcgttttgcg ctgcttcgog atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtctcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtagccc cctattgaog tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca	600
tcgtattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttocaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggog	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900

ES 2 609 250 T3

gttaaacgg gcccgacgtc gcatgctccc ggccgccatg gacttcgggt tgagcttggt 960
 tttccttgcc cttattttaa aaggtgtcca gtgtgacgtg cagctgggtg agtctggggg 1020
 agacttagtg cagcctggag ggtccctgaa actctcctgt gcagtctctg gattcacttt 1080
 cagtagctat ggcatgtctt gggttcgcca gactccagac aagaggctgg aattggtcgc 1140
 aaccattaat gagaatggag gtagcaccta ttatccagac agtgtgaggg gccgtttcac 1200
 catctccaga gacaatgccc agaacaccct gtacttgcaa atgagcagtc tgaagtctga 1260
 ggatacagcc atgtattact gtgcaaggga gacctccggt agaaggtact ggttttacct 1320
 cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca ggaggtggcg gatcaggagg 1380
 cggaggttct ggaggagggt ggagtcaaat tgttctctcc cagtctccag caatcatgtc 1440
 tgcatttcca ggggagaggg tcaccatgac ctgcagtgcc agctcaagtg taagttatat 1500
 gttctggtac cagcagaagc caggatcctc cccagactc ctgatttatg acacatccaa 1560
 cctggcttct ggagtccctg ttcgcttcag tggcagtggg tctgggacct cttactctct 1620
 cacaatcagc cgaatggagg ctgaagatgc tgccactttt tactgccaac agtgggtttc 1680
 ttaccacccg acgttcggtg gaggcaccaa ggtggagatc aaacgggagt ttcctaagcc 1740
 ctccaccct cctggttctt ccggtggcgc tctcgagatg agtcttctaa ccgaggtcga 1800
 aacgcctatc agaaacgaat gggggtctag atctaacggt tcaagtgatc ctatgagtct 1860
 tctaaccgag gtcgaaacgc ctatcagaaa cgaatggggg tctagatcta acggttcaag 1920
 tgatcctatg agtcttctaa ccgaggtcga aacgcctatc agaaacgaat gggggtctag 1980
 atctaacggt tcaagtgatc ctatgagtct tctaaccgag gtcgaaacgc ctatcagaaa 2040
 cgaatggggg tctagatcta acggttcaag tgatcctact agtcgtttta accatcatca 2100
 tcatcatcat cattaaccg ggaatcgaat tccaccacac tggactagtg gatccgagct 2160
 cggtaaccaag cttaagttta aaccgtgat cagcctcgac tgtgccttct agttgocagc 2220
 catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgacct ggaagggtgc actcccactg 2280
 tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gtagtagtgt cattctattc 2340
 tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 2400
 ctgggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg 2460
 ggtatcccca cgcgcctgt agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca 2520
 gcgtgaccgc tacacttgcc agcgcctag cgcgcctcc ttctgctttc ttcccttct 2580
 ttctcgccac gttcgccggc ttcccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt 2640
 tccgatttag tgctttacgg cactcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac 2700
 gtagtgggac atcgccctga tagacggtt ttccgccttt gacgttggag tccacgttct 2760
 ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caaactcaa ccctatctcg gtctattctt 2820

ttgattttata agggatttttg cggatttcgg cctatttggtt aaaaaatgag ctgatttaac	2880
aaaaatttaa cgcgaattaa ttctgtggaa tgtgtgtcag ttaggggtgtg gaaagtcccc	2940
aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcacatc aattagtcag caaccagggtg	3000
tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc	3060
agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc ctaactccgc ccagttccgc	3120
ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat gcagaggccg aggcgcctc	3180
tgctctgag ctattccaga agtagtgagg aggtttttt ggaggcctag gcttttgcaa	3240
aaagctcccg ggagcttgta tatccatttt cggatctgat caagagacag gatgaggatc	3300
gtttcgcag attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag	3360
gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg	3420
gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtaagacc gacctgtccg gtgccctgaa	3480
tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacggcg ttccttgccg	3540
agctgtgctc gacgttgta ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc	3600
ggggcaggat ctctgtcat ctacacttgc tcctgcgag aaagtatcca tcatggctga	3660
tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa	3720
acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct	3780
ggacgaagag catcaggggc tcgcccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat	3840
gcccgaaggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt	3900
ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta	3960
tcaggacata gcgttgcta ccctgatata tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga	4020
ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcatcg ccttctatcg	4080
ccttcttgac gagttctct gagcgggact ctggggttcg aaatgaccga ccaagcgacg	4140
cccaacctgc catcacgaga tttagattcc accgcgcct tctatgaaag gttgggcttc	4200
ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag	4260
ttcttogccc accccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc	4320
atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa	4380
ctcatcaatg tatcttatca tgtctgtata ccgtcgacct ctagctagag cttggcgtaa	4440
tcatggctcat agctgtttcc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattcc acacaacata	4500
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gaggagcta actcacatta	4560
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgctgtgcca gctgcattaa	4620
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctcgc	4680

ES 2 609 250 T3

ctcactgact	cgctgcgctc	ggcgttccg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tactcaaaag	4740
gcgtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	4800
ggccagcaaa	aggccaggaa	cgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggctc	4860
cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	4920
ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tctgttccg	4980
accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgctttct	5040
catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggctg	ttcgctccaa	gctgggctgt	5100
gtgcacgaac	cccccgttca	gcccgaaccg	tcgccttat	ccggtaaacta	tcgtcttgag	5160
tccaaccg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	5220
agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	5280
actagaagaa	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	5340
gttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcggtttttt	tgtttgcaag	5400
cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	5460
tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	5520
aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	5580
tatgagtaaa	cttggctctga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	5640
atctgtctat	ttcgttcatc	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	5700
cgggagggct	taccatctgg	cccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgtccaccg	5760
gtccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaagg	ccgagcgag	aagtggctct	5820
gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	5880
tcgccagtta	atagtttgcg	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	5940
tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	6000
tccccatgt	tgtgcaaaaa	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	6060
aagttggccg	cagtgttatc	actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	6120
atgccatccg	taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	6180
tagtgtatgc	ggcgaccgag	ttgtcttgc	ccggcgtaa	tacgggataa	taccgcgcca	6240
catagcagaa	ctttaaaagt	gtcatcatt	ggaaaacgtt	cttcggggcg	aaaactctca	6300
aggatcttac	cgctgttgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	6360
tcagcatctt	ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	6420
gcaaaaaagg	gaataagggc	gacacggaaa	tgttgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	6480
tattattgaa	gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	6540
tagaaaaata	aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgct	6600

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 acoplado a una sustancia a ser suministrada en cualquier compartimento celular requerido, incluyendo el suministro dentro del núcleo o del nucléolo, para uso en la prevención o tratamiento de enfermedades humanas o animales.
2. Péptido acoplado a una sustancia, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades humanas o animales, mediante el transporte y/o el suministro de sustancias terapéuticas a cualquier compartimento celular requerido, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 se selecciona entre: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, y el péptido que comprende la SEQ ID NO: 3 es el péptido de SEQ ID NO: 11.
3. Péptido acoplado a una sustancia, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades humanas o animales, mediante el transporte y/o el suministro de sustancias terapéuticas a cualquier compartimento celular requerido, de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sustancia se selecciona de: derivados hormonales, factores de crecimiento, péptidos, proteínas, polímeros, polisacáridos, enzimas, lípidos, ácidos nucleicos, fármacos o productos farmacéuticos; o sustancias inorgánicas preferentemente seleccionadas entre: metales, oro, óxido de hierro o compuestos magnéticos.
4. Péptido acoplado a una sustancia, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades humanas o animales, mediante el transporte y/o el suministro de sustancias terapéuticas a cualquier compartimento celular requerido, de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la sustancia se selecciona entre: fármacos antiinflamatorios; fármacos analgésicos; interferones; citocinas; anticuerpos; flagelina de *Salmonella*; antígenos, preferentemente, TERT, M2 del virus de la gripe o ACE; agentes antitumorales, preferentemente, leucovorina o péptidos inhibidores de TERT; agentes terapéuticos o indicadores diagnósticos.
5. Péptido acoplado a una sustancia, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades humanas o animales, mediante el transporte y/o el suministro de sustancias terapéuticas a cualquier compartimento celular requerido, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, unido a una nanopartícula funcionalizada.
6. Nanopartícula funcionalizada fusionada o unida a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
7. Nanopartícula funcionalizada, de acuerdo con la reivindicación 6, fusionada o unida a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.
8. Nanopartícula funcionalizada, de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, que comprende adicionalmente al menos un adyuvante.
9. Nanopartícula funcionalizada, de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el adyuvante es al menos uno seleccionado entre: polímeros, preferentemente PEG, protamina o avidina.
10. Composición que comprende las nanopartículas funcionalizadas de las reivindicaciones 6 a 9 acopladas a una sustancia a suministrar en cualquier compartimento celular requerido, incluyendo el suministro dentro del núcleo o el nucléolo.
11. Vacuna que comprende la composición de la reivindicación 10.
12. Antiviral que comprende la composición de la reivindicación 10.
13. Composición de la reivindicación 10 para su uso en la prevención, tratamiento o diagnóstico de tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades congénitas, enfermedades del sistema nervioso, cicatrización, curación de quemaduras o enfermedades inflamatorias.
14. Composición de la reivindicación 10 para su uso en terapia génica.

FIGURA 1

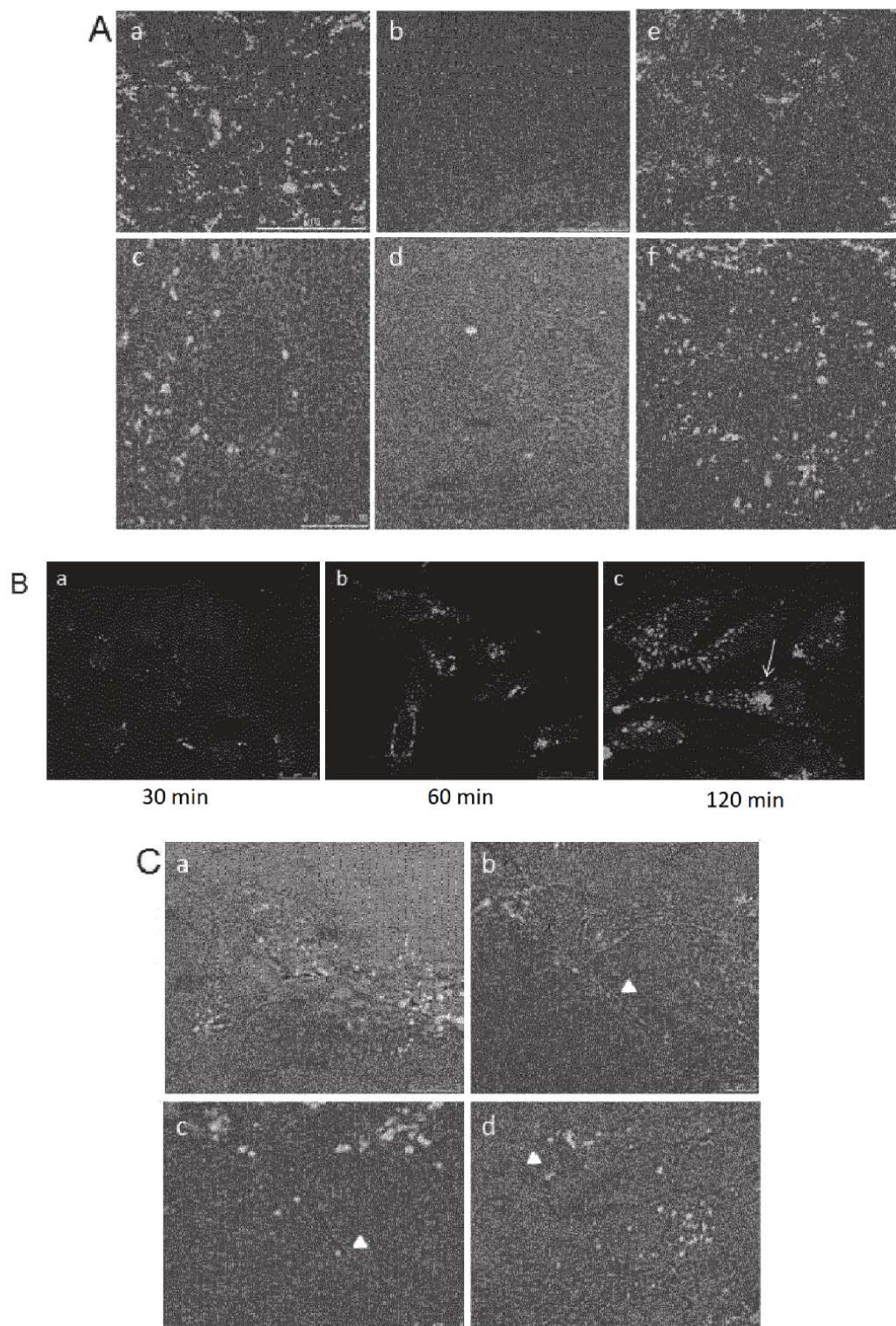


FIGURA 2

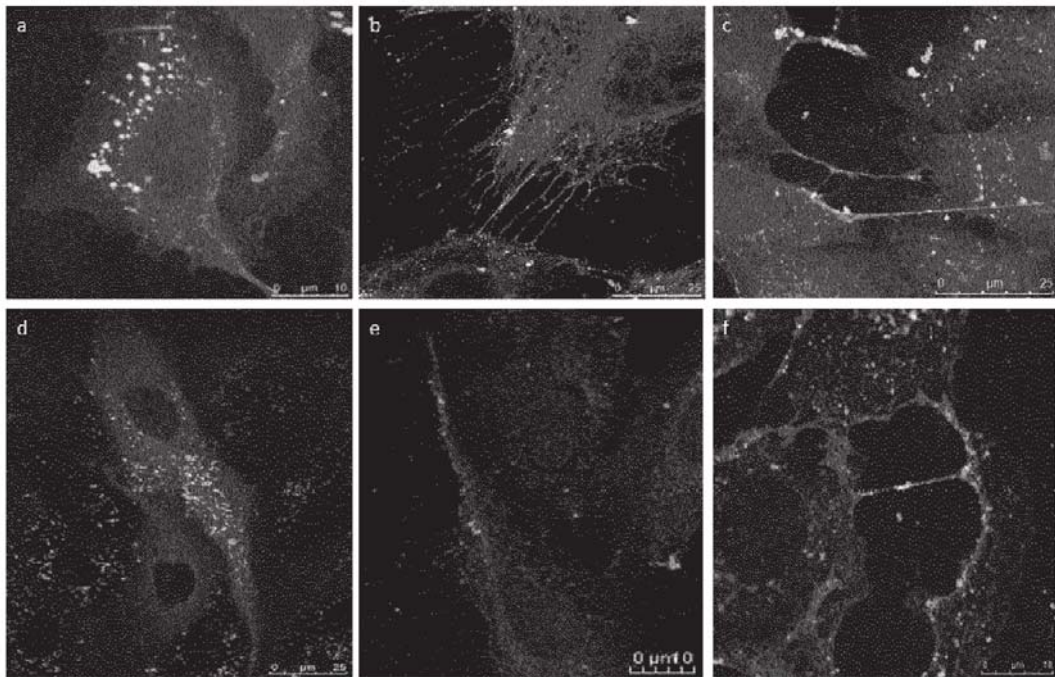


FIGURA 3

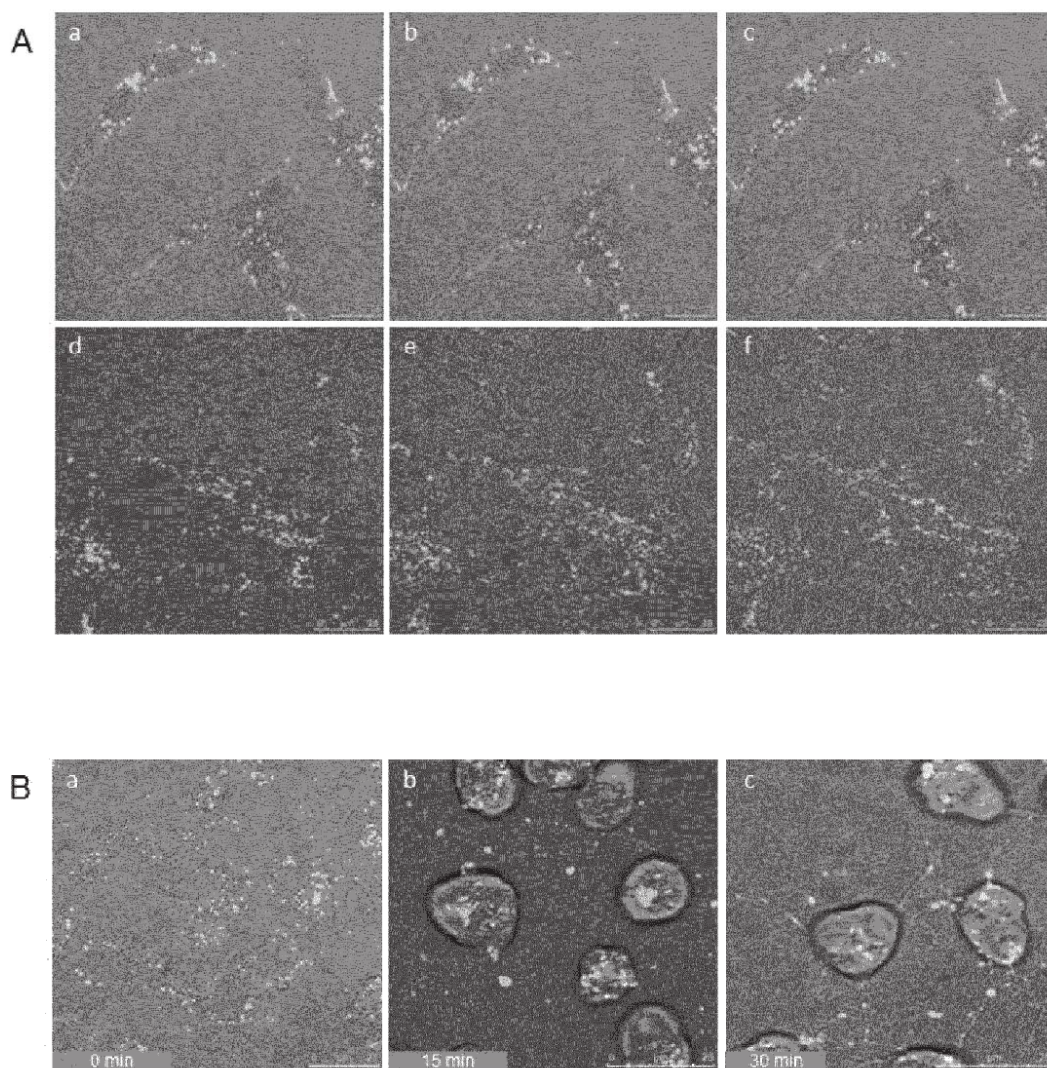


FIGURA 4

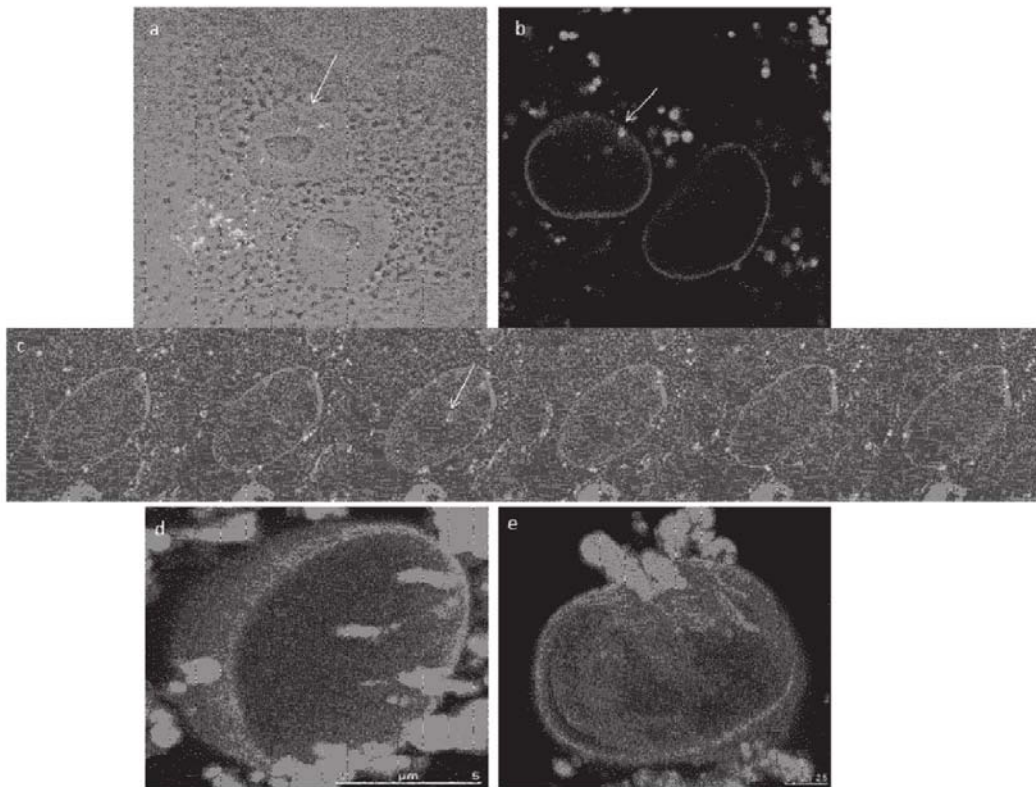


FIGURA 5



Recuentos de células

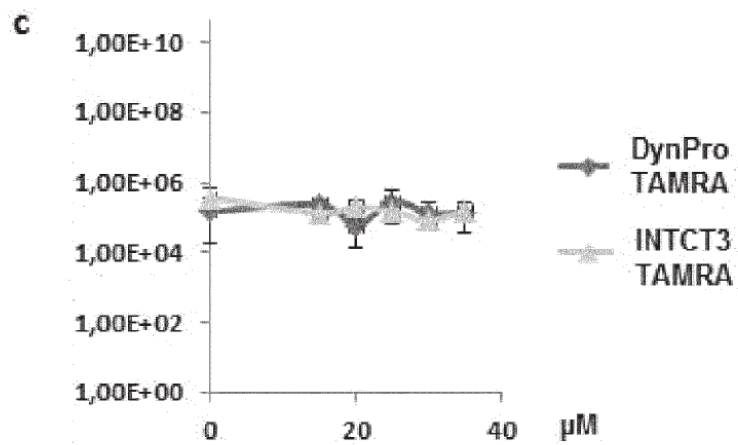
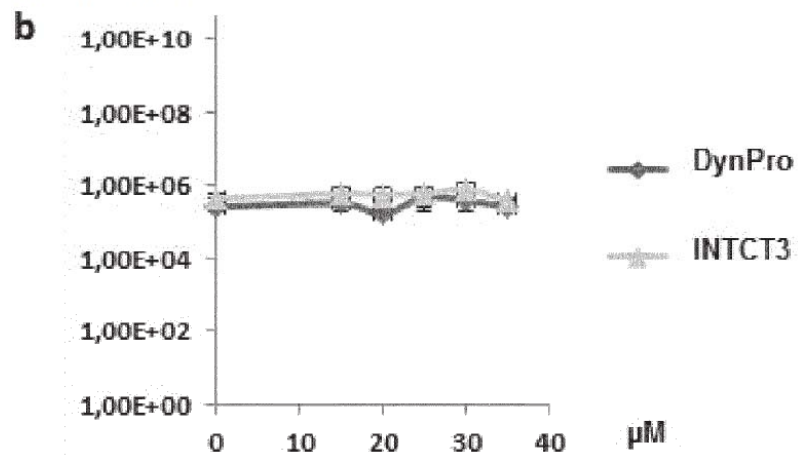


FIGURA 5

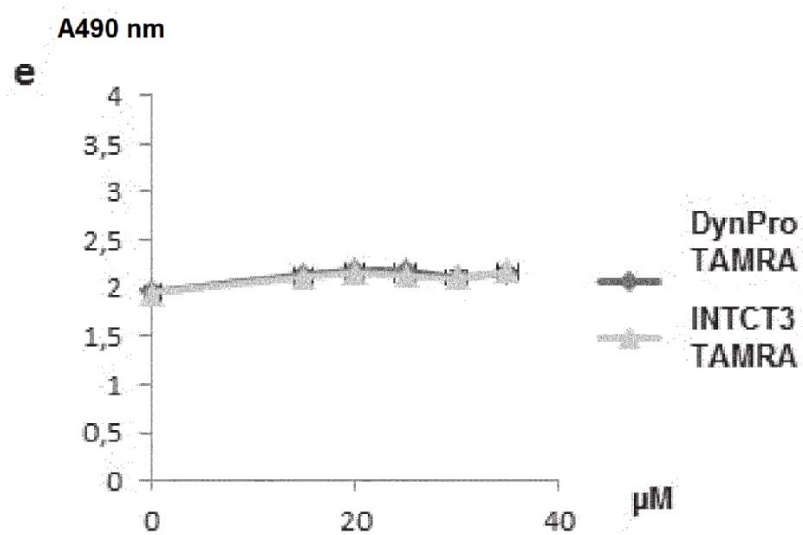
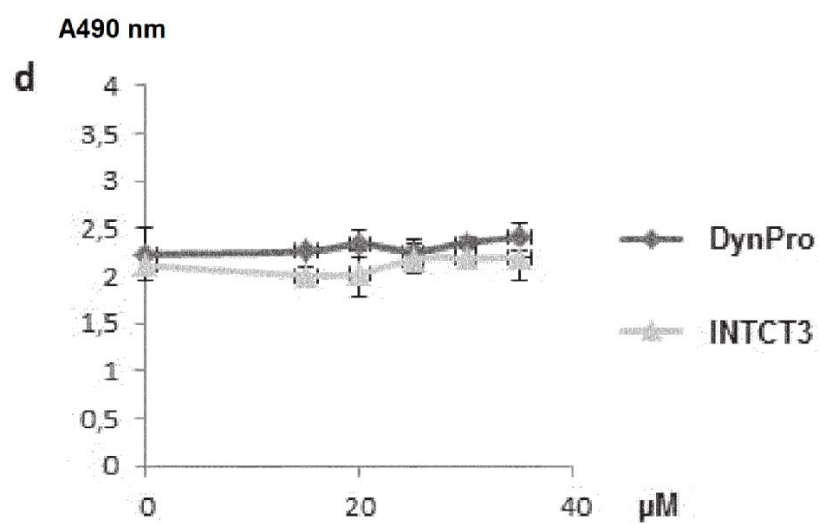
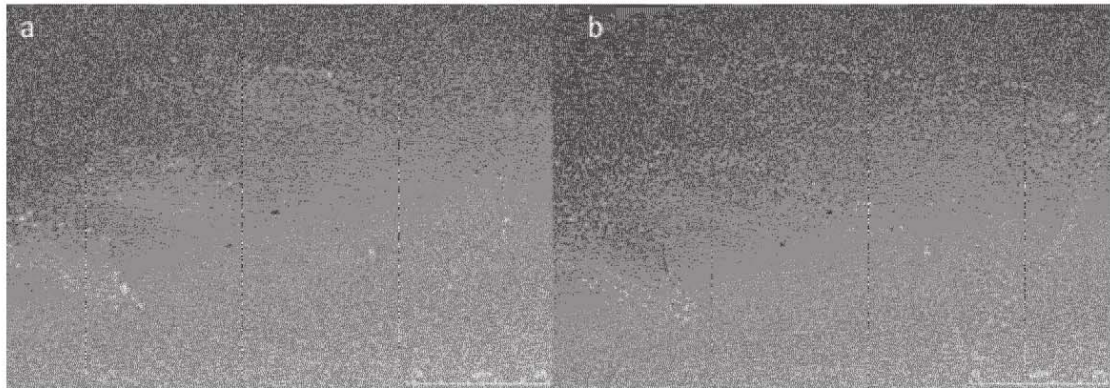


FIGURA 6



Grupo A: DynPro + Al de Freud (AIF)
 Grupo B: M2 + AIF
 Grupo C: M2-DynPro + AIF
 Grupo D: M2-DynPro

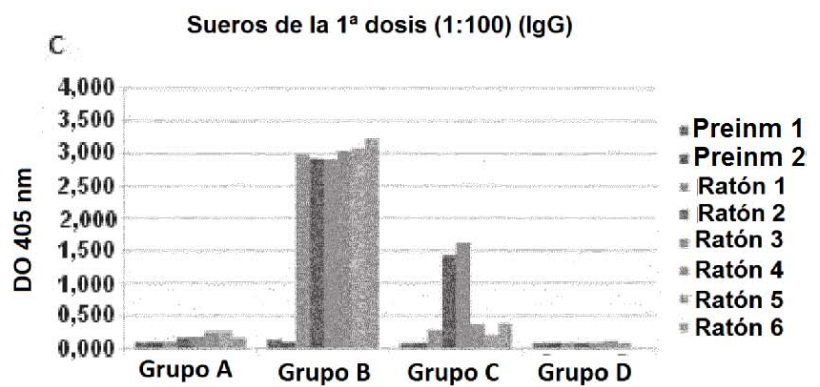


FIGURA 6

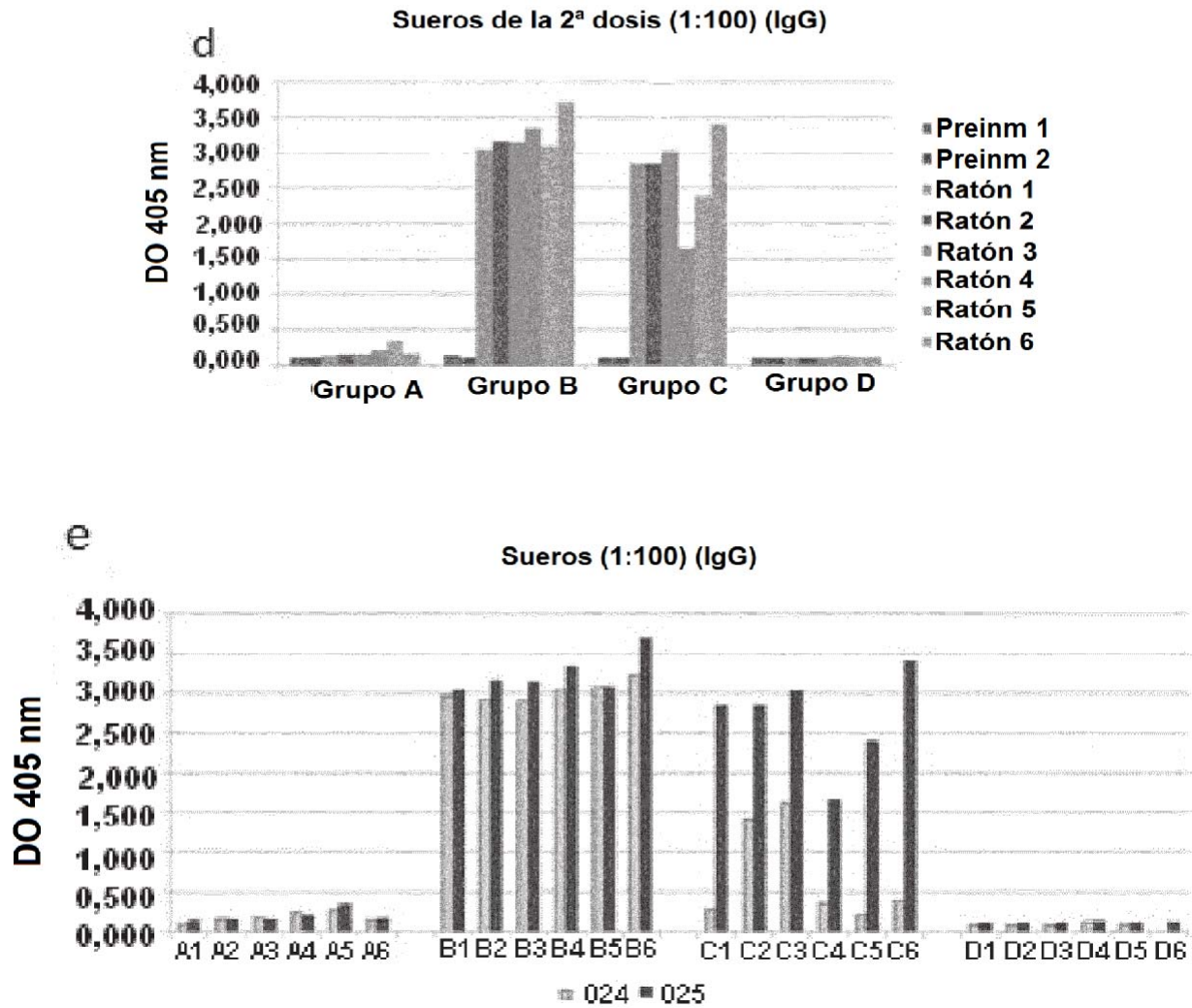


FIGURA 7

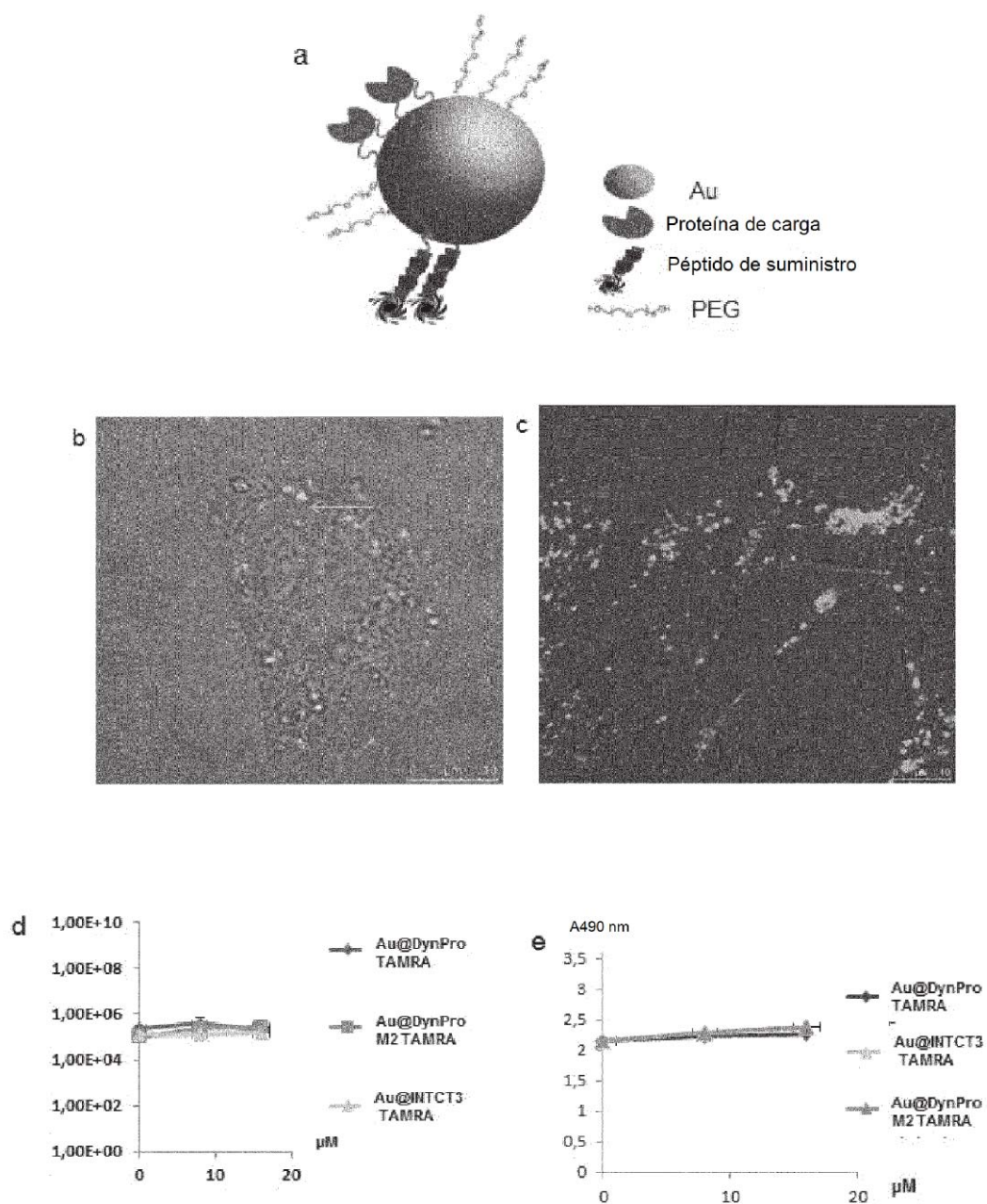


FIGURA 8A

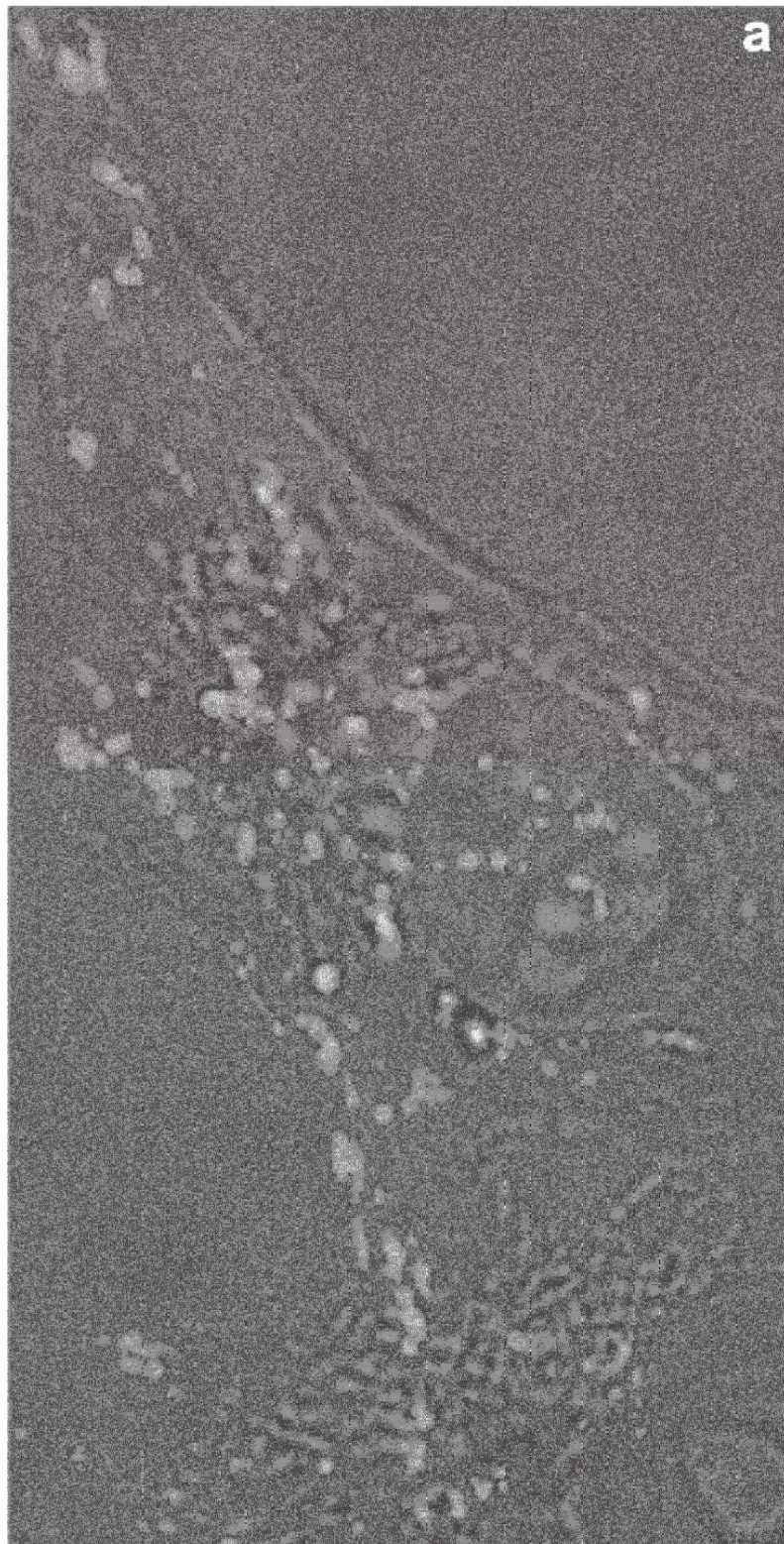


FIGURA 8B

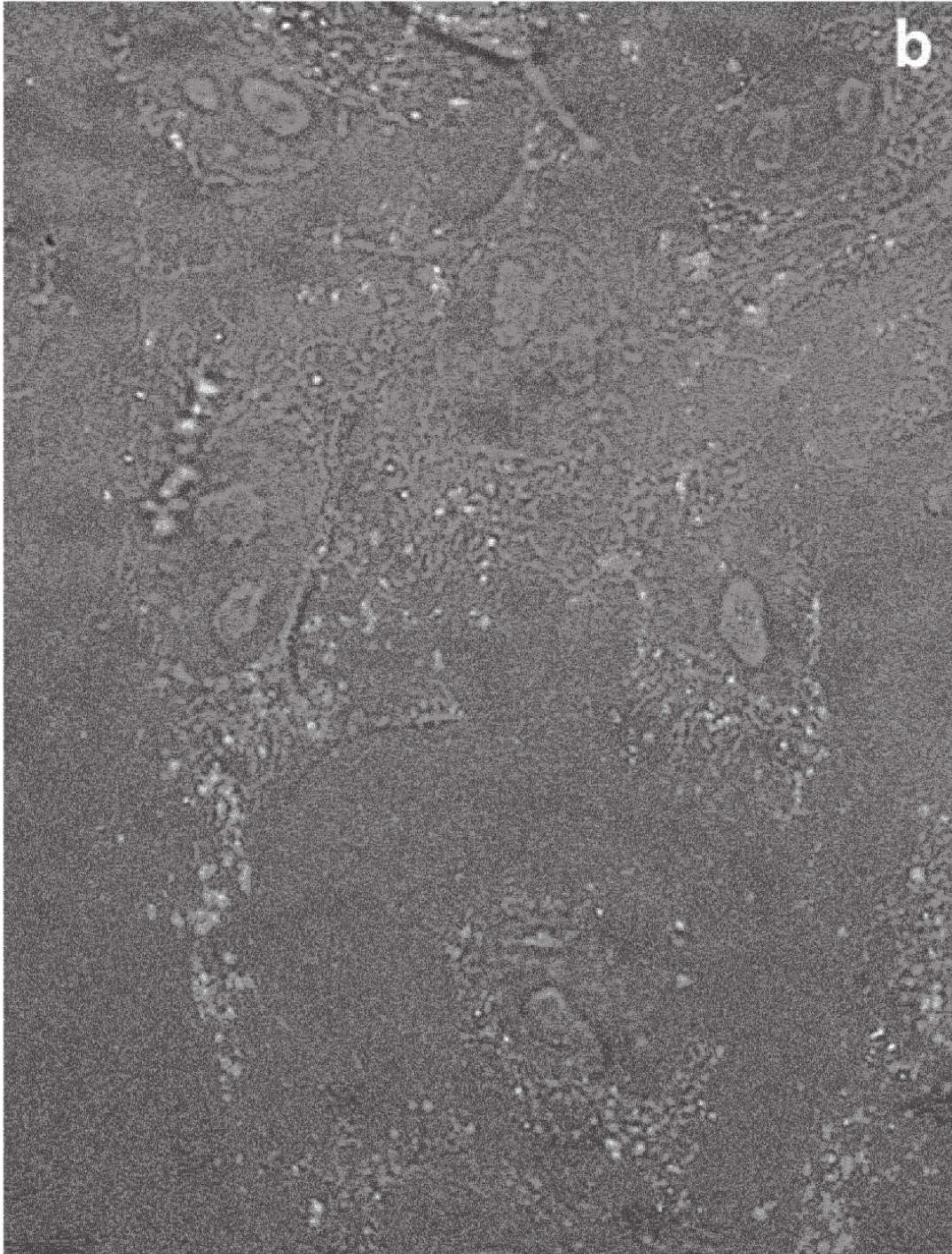


FIGURA 8C

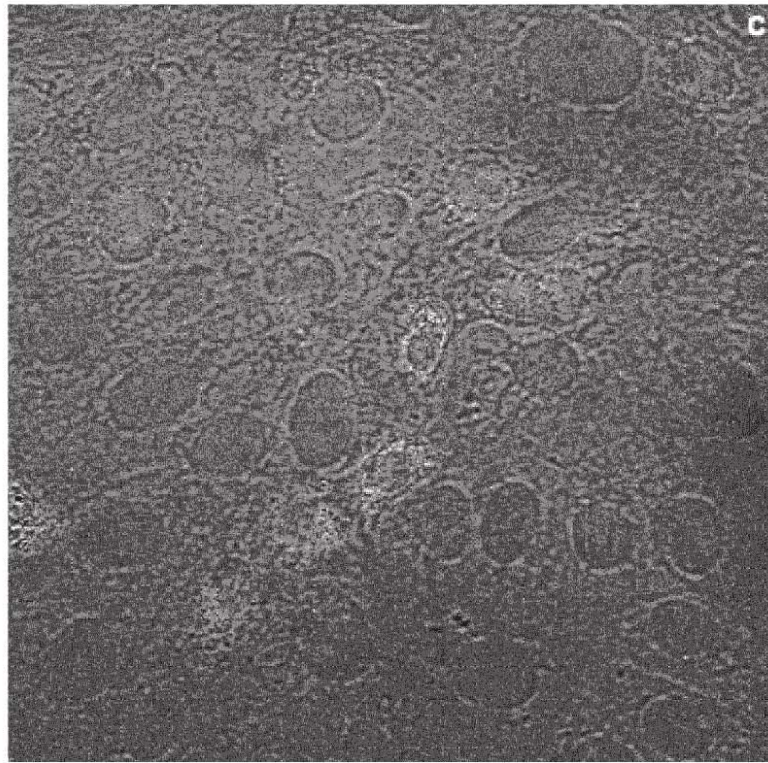


FIGURA 8D

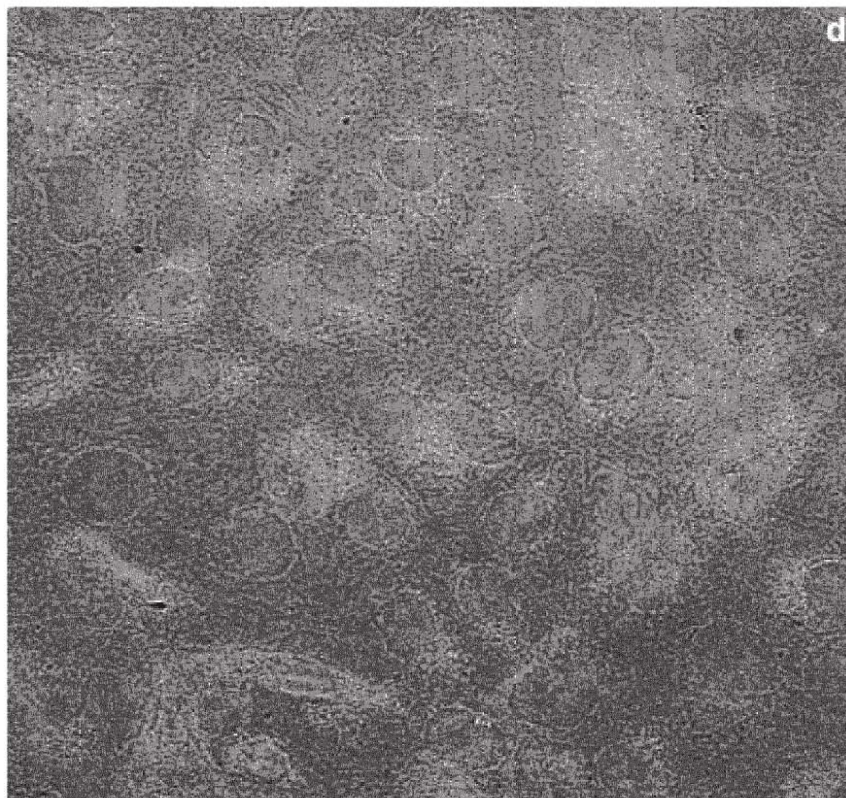


FIGURA 8E

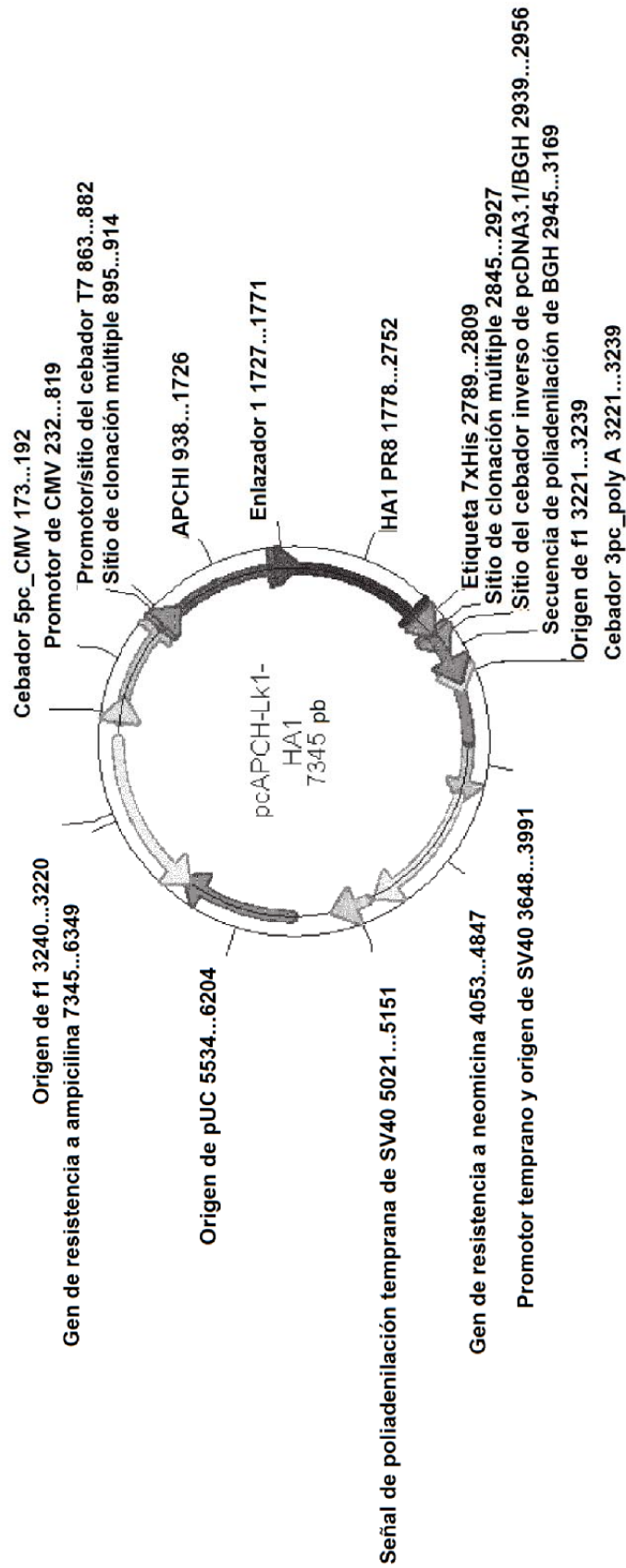
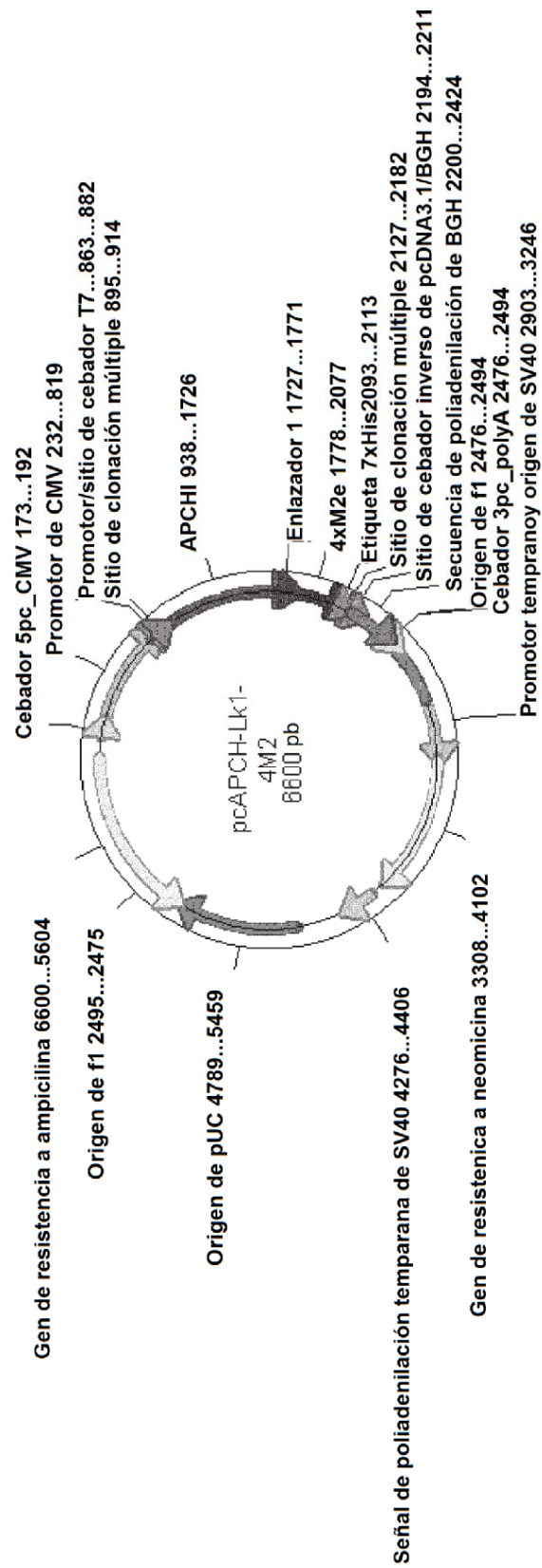


FIGURA 8F



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2004015083 A [0019]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- BAO L ; GUO H ; HUANG X ; TAMMANA S ; WONG M ; MCIVOR RS ; ZHOU X. High-titer lentiviral vectors stimulate fetal calf serum-specific human CD4 T-cell responses: implications in human gene therapy. *Gene Ther*, 2009, vol. 16, 788-95 [0157]
- BAREFORD, L. M. ; SWAAN, P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, vol. 59, 748-758 [0157]
- BRANDEN L.J. ; A.J. MOHAMED ; C.I.E. SMITH. A peptide nucleic acid nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 784-787 [0157]
- CIOLINA C. ; G. BYK ; F. BLANCHE ; V. THUILLIER ; D. SCHERMAN ; P. WILS. Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin. *Bioconjug. Chem.*, 1999, vol. 10, 49-55 [0157]
- DUJARDIN D.L. ; L.E. BARNHART ; S.A. STEHMAN ; E.R. GOMES ; G.G. GUNDERSEN ; RICHARD B. VALLEE. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *The Journal of Cell Biology*, 2003, vol. 163 (6), 1205-1211 [0157]
- FUTAKI S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, vol. 57, 547-558 [0157]
- HAMBLEY, T.W. ; W.N. HAIT. Is anticancer drug development heading in the right direction?. *Cancer Res.*, 2009, vol. 69, 1259-1262 [0157]
- HOWARD, M. D. ; JAY, M. ; DZIUBLAL, T. D. ; LU, X. L. PEG ylation of nanocarrier drug delivery systems: state of the art. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2008, vol. 4, 133-148 [0157]
- ICHINOHE T ; PANG IK ; IWASAKI A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.*, 2010, vol. 11, 404-10 [0157]
- IYER, A.K. ; G. KHALED ; J. FANG ; H. MAEDA. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today.*, 2006, vol. 11, 812-818 [0157]
- LIAO C ; ZHAO MJ ; ZHAO J et al. Overexpression of LPTS-L in hepatocellular carcinoma cell line SM-MC-7721 induces crisis. *World J Gastroenterol*, 2002, vol. 8, 1050-1052 [0157]
- MELO S.A. ; C. MOUTINHO ; S. ROPERO ; G.A. CALIN ; S. ROSSI ; R. SPIZZO ; A.F. FERNANDEZ ; V. DAVALOS ; A. VILLANUEVA ; G. MONTOYA. A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells. *Cancer Cell*, 2010, vol. 18, 303-315 [0157]
- MOFFATT S ; HAYS J ; HOGENESCH H ; MITTAL SK. Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: implications in gene therapy. *Virology*, 2000, vol. 272, 159-167 [0157]
- PANTE, N. ; KANN, M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of similar to 39 nm. *Mol. Biol. Cell*, 2002, vol. 13, 425-434 [0157]
- ROTHBARD J.B. ; T.C. JESSOP ; R.S. LEWIS ; B.A. MURRAY ; P.A. WENDER. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, 9506-9507 [0157]
- SALINA D. ; K. BODOOR ; D. MARK ECKLEY ; T.A. SCHROER ; J.B. RATTNER ; B. BURKE. Cytoplasmic Dynein as a Facilitator of Nuclear Envelope Breakdown. *Cell*, 2002, vol. 108, 97-107 [0157]
- SANDGREN S. ; F. CHENG ; M. BELTING. Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell surface proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 38877-38883 [0157]
- SEBESTYEN M.G. ; J.J. LUDTKE ; M.C. BASSIK ; G. ZHANG ; V. BUDKER ; E.A. LUKHTANOV ; J.E. HAGSTROM ; J.A. WOLFF. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat. Biotechnol.*, 1998, vol. 16, 80-85 [0157]
- SUBRAMANIAN A. ; P. RANGANATHAN ; S.L. DIAMOND. Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 873-877 [0157]
- SUGAHARA, K.N. ; T. TEESALU ; P.P. KARMALI ; V.R. KOTAMRAJU ; L. AGEMY ; O.M. GIRARD ; D. HANAHAN ; R.F. MATTREY ; E. RUOSLAHTI. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell*, 2009, vol. 16, 510-520 [0157]

- **TEMPLETON, A. C. ; CHEN, S. ; GROSS, S. M. ; MURRAY, R. W.** *Langmuir*, 1999, vol. 15, 66-76 [0157]
- **WADIA J.S. ; R.V. STAN ; S.F. DOWDY.** Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.*, 2004, vol. 10, 310-315 [0157]
- **WAGNER, E.** Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, vol. 38, 279-289 [0157]
- **WANG G. ; X. GAO ; Y. HUANG ; Z. YAO ; Q. SHI ; M. WU.** Nucleophosmin/B23 Inhibits Eg5-mediated Microtubule Depolymerization by Inactivating Its ATPase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, 19060-19067 [0157]
- **ZARO J.L. ; W.C. SHEN.** Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides. *Biochem. Biophys. Res. C*, 2003, vol. 307, 241-247 [0157]
- **ZHOU XZ ; KP LU.** The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1Is a Potent Telomerase Inhibitor. *Cell*, 2001, vol. 107, 347-359 [0157]
- **ZIEGLER A. ; P. NERVI ; M. DUERRENBERGER ; J. SEELIG.** The cationic cell-penetrating peptide CPPTAT derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, 138-148 [0157]