

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 337**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2012 PCT/KR2012/009997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13077680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2012 E 12852409 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2784081**

54 Título: **Desarrollo de nuevo dominio de transducción macromolecular con mejor permeabilidad celular y método de uso del mismo**

30 Prioridad:

23.11.2011 US 201161563110 P

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

03.07.2017

73 Titular/es:

**Procell Therapeutics Inc. (100.0%)
No 1009, ACE Twin Tower II 212-30 Guro 3-dong,
Guro-gu
Seoul 152-779, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, KI DEOK;
LEE, KANG JIN;
LIM, SUNNY;
LEE, BYUNG KYU y
KIM, JONG RAE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 337 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

Desarrollo de nuevo dominio de transducción macromolecular con mejor permeabilidad celular y método de uso del mismo.

5 Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un dominio de transducción macromolecular modificado (MTD) que tiene una permeabilidad celular mejor que la de un MTD convencional debido a la modificación de una secuencia de aminoácidos del MTD convencional, que facilita el suministro de una molécula biológicamente activa a una célula, y a un método de fabricación del mismo, un polinucleótido que codifica el MTD modificado, un método de ingeniería genética de una molécula biológicamente activa para que tenga permeabilidad celular usando el MTD modificado y un método de importación de una molécula biológicamente activa a una célula usando el MTD modificado.

15 Antecedentes de la técnica

20 Una membrana celular sirve como obstáculo para la permeabilidad de las proteínas, los ácidos nucleicos, los péptidos y los compuestos insolubles en las células debido a la impermeabilidad. Este problema en la transducción intracelular de fármacos debe resolverse en los campos del tratamiento, de la prevención y del diagnóstico de enfermedades. En general, los métodos de permeación de macromoléculas biológicamente activas en una membrana celular incluyen la electroporación, la fusión de membrana usando un liposoma, la transfección usando fosfato de calcio, un polímero catiónico tal como polietilimina (PEI) o DEAE-dextrano, la transfección vírica y la microinserción de una sola célula. Además, recientemente, para la transducción eficaz de fármacos intracelulares, se han usado técnicas de aplicación de endocitosis de un sistema de suministro de fármacos tales como nanopartículas, pero se necesitan más estudios para conseguir un suministro eficaz de fármacos intracelulares debido a una reducción de la eficacia del suministro provocada por la pérdida rápida en un sistema inmune o al impedimento estérico causado por la interacción con las células. Por consiguiente, recientemente, se ha necesitado de manera continua el desarrollo de un método para suministrar macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, etc. a través de una biomembrana y una envoltura nuclear de una célula sin dañar una membrana celular.

30 En 1988, el grupo de Green y Loewenstein (Green y Loewenstein. *Cell* 55, 1179-1188 (1988)) y el grupo de Frankel y Pabo (Frankel y Pabo. *Cell* 55, 1189-1193 (1988)) descubrieron cada uno un dominio de transducción que permeaba una proteína asociada a la transcripción, Tat, del VIH-1, que es el virus que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), a través de una membrana celular y de la transactivación de un gen vírico. Un dominio Tat que muestra permeabilidad celular es una secuencia del 48º a 57º aminoácido básico (GRKKRRQRRR) de la proteína Tat, y se encontró que la secuencia desempeña un papel importante en la permeación de la membrana celular (Vives *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272, 16010-16017 (1997); Futaki *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276, 5836-5840 (2001); Wadia, J. S. y S. F. Dowdy, *Cum Opin. Biotechnol.* 13(1): 52-6 (2002); Wadia *et al.*, *Nature Medicine* 10(3), 310-315(2004)).

40 Como otro ejemplo, se puede usar penetratina derivada del homeodominio de *Antennapedia* (RQIKIYFQNRMMKWKK) compuesta de 16 péptidos (Joliot *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 88: 1864-1868 (1991); Derossi *et al.*, *J Biol Chem* 269, 10444-10450 (1994); Joliot, A. y A. Prochiantz, *Nat. Cell Biol.* 6(3): 189-96 (2004)), y además de la penetratina, las secuencias peptídicas que tienen secuencias y mecanismos similares se denominan, en general, dominios de transducción de proteínas (PTD). Se ha desvelado que se realizó un mecanismo de transducción de material intracelular de dicho PTD interrumpiendo una membrana celular en una superficie celular y suministrando un material a la célula, o acumulando un material en un endosoma a través de la endocitosis causada por la interacción electrostática entre una carga negativa de diversos glicanos de una proteína de membrana presente en la superficie de la célula y una carga positiva de restos de aminoácidos básicos que constituyen el PTD para su administración a la célula, no mediante permeación directa de un material dentro de la membrana celular ((J. S. Wadia, *et al.*, *Nat. Med.* 10: 310-315 (2004); I. Nakase, *et al.*, *Biochemistry* 46: 492-501 (2007); H. L. Amand, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* (2011)). Sin embargo, dicho mecanismo de transducción de material del PTD tiene dificultad para transducir materiales tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc., en un tejido profundo de un cuerpo vivo. En particular, los péptidos o las proteínas se acumulan en un endosoma, y cuando se unen a lisosomas en la célula, son degradados fácilmente por una proteasa del lisosoma. Por consiguiente, cuando los péptidos o las proteínas se transducen en una concentración suficientemente alta usando el PTD, puede emitirse un componente eficaz capaz de actuar sobre una diana en un citoplasma procedente del endosoma, lo que se convierte en un problema que ocurre en la transducción de proteínas usando el PTD (F. Milletti, *Drug Discovery Today* 17: 850-860 (2012)).

60 Más tarde, en la primera década de este siglo, se sintetizó y se fabricó MTS (AAVLLPVLLAAP) derivado de un péptido señal de un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (DaeWoong Jo *et al.*, *Nat. Biotech.* Vol. 19, 2001). El MTS se compone de 12 aminoácidos hidrófobos, en los que hay una valina y dos leucinas presentes entre una secuencia que tiene de manera continua dos alaninas, y se incluye una prolina, y tiene características muy diferentes del PTD convencional. Además, recientemente, como un dominio de transducción mejorado, se desarrolló un nuevo péptido permeable a la membrana celular que tiene una mayor eficacia en el suministro de materiales a las células que el PTD y MTS, y diferentes características estructurales y electrostáticas, y el péptido era un dominio de

transducción macromolecular (MTD) (véase el documento WO 2008/093982).

5 Cuando se usa el MTD, que fue tecnología desarrollada por los inventores, a diferencia de la transducción en una célula de VIH-TAT, no se necesitan endocitosis ni energía en la transducción intracelular de un material, y la rigidez e integridad de la membrana celular para la interacción directa con la membrana celular sirven como factores importantes, y por lo tanto, también se puede realizar la transducción continua entre células. Por esta razón, el MTD tiene una alta eficiencia de suministro de una proteína diana a una célula, y permite la liberación en un tejido profundo de un cuerpo vivo, en comparación con TAT, que es un péptido convencional permeable a la membrana celular. Además, se fabrica un MTD hidrófobo derivado de una secuencia señal de una proteína secretora o una proteína de membrana celular modificando una secuencia de una región hidrófoba de un péptido señal ampliamente compuesto de tres partes incluyendo una región hidrófoba en un extremo N-terminal y sitios de escisión de proteínas secretadas en el extremo C-terminal, formando la región hidrófoba una estructura de hélice para tener una actividad dirigida a la membrana celular. El MTD penetra directamente a través de la membrana celular sin dañar una célula, y permite la introducción de macromoléculas tales como las proteínas en la célula para que presenten sus propias funciones.

15 Sin embargo, dado que el MTD normalmente se compone de aminoácidos hidrófobos y, por lo tanto, tiene una reducción de las propiedades físicas y la disponibilidad, cuando se fabrica en relación con un péptido o una proteína fuertemente hidrófobo, el MTD puede precipitarse cuando se funde en una condición de tampón general a una concentración predeterminada o más, o de acuerdo con una característica de un material transductor. Por consiguiente, también puede ser necesaria la combinación con el MTD, que no se precipite dentro de un intervalo de concentraciones que se vaya a usar y que presente una permeabilidad y actividad óptimas en cuanto a las características de un material que se vaya a transducir.

20 Por lo tanto, los inventores desarrollaron un nuevo dominio permeable a la membrana celular que tenía mejor permeabilidad de la membrana celular mediante la eliminación o modificación en una secuencia de aminoácidos, o fusión quimérica, para mejorar las propiedades físicas y la disponibilidad del MTD convencional y aumentar la permeabilidad de la membrana celular, y confirmaron un efecto de transducción intracelular del mismo, demostrando así un efecto más mejorado que el MTD convencional. De este modo, se completó la presente invención.

25 Divulgación

Problema técnico

30 La presente invención se inventó para desarrollar el péptido anteriormente descrito que tiene una permeabilidad celular más excelente mediante la modificación de una secuencia de aminoácidos del péptido MTD convencional, y se dirige a proporcionar un MTD modificado que tiene mejores permeabilidad de la membrana celular y propiedades físicas debido a la eliminación, modificación o fusión quimérica a una secuencia de aminoácidos del MTD convencional, y un polinucleótido que codifica el MTD modificado.

35 La presente invención también se dirige a proporcionar un método de ingeniería genética de una molécula biológicamente activa usando el MTD modificado para que tenga permeabilidad celular, y un método de introducción de una molécula biológicamente activa en una célula usando el MTD modificado.

40 Sin embargo, los objetos técnicos que se han de conseguir en la presente invención no se limitan a los objetos anteriormente descritos, y otros objetos que no se describirán serán comprendidos claramente a partir de las siguientes descripciones por los expertos en la materia.

45 Solución técnica

50 Aspectos de la presente invención proporcionan un péptido representado por la Fórmula 1, en la que A1 es metionina (M, Met); A2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina (R, Arg), histidina (H, His) y lisina (K, Lys); y el MTD tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1 a 7:

55 [Fórmula 1] A1-A2-MTD; y

y un polinucleótido que codifica el péptido.

60 En una realización de la presente invención, el péptido media el transporte de una molécula biológicamente activa dentro de una célula, y tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 15 a 35.

65 En otra realización de la presente invención, el polinucleótido tiene una secuencia de bases seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 36 a 56.

- En una realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 15 puede codificarse con la secuencia de SEQ. ID. NO: 36, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 5 En otra realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 16 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 37, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 17 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 38, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 10 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 18 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 39, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 19 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 40, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 15 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 20 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 41, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 21 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 42, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 20 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 22 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 43, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 23 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 44, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 25 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 24 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 45, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 30 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 25 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 46, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 26 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 47, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 35 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 27 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 48, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 28 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 49, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 40 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 29 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 50, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 45 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 30 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 51, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 31 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 52, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 50 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 32 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 53, pero la presente invención no se limita a la misma.
- En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 33 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 54, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 55 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 34 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 55, pero la presente invención no se limita a la misma.
- 60 En otra realización más de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 35 puede codificarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 56, pero la presente invención no se limita a la misma.
- Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de ingeniería genética de una molécula biológicamente activa que tiene permeabilidad celular, que incluye fijar un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 15 a 35 a una molécula biológicamente activa.
- 65

En una realización de la presente invención, la fijación se realiza uniendo una molécula biológicamente activa a un extremo N-terminal, un extremo C-terminal o ambos extremos del péptido.

5 En otra realización de la presente invención, la fijación se realiza uniendo aminoácidos del péptido dispuestos inversamente a un extremo C-terminal de la molécula biológicamente activa.

En otra realización más de la presente invención, la unión se realiza mediante enlaces peptídicos o enlaces químicos.

10 En otra realización más de la presente invención, el enlace químico puede seleccionarse entre enlaces disulfuro, enlaces diamina, enlaces sulfuro-amina, enlaces carboxilo-amina, enlaces éster y enlaces covalentes.

15 En otra realización más de la presente invención, la molécula biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos y péptidos.

En otra realización más de la presente invención, la molécula biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento, enzimas, factores de transcripción, toxinas, péptidos antigénicos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

20 En otra realización más de la presente invención, la molécula biológicamente activa se puede seleccionar entre enzimas, hormonas, proteínas portadoras, inmunoglobulinas, anticuerpos, proteínas estructurales, proteínas de función motora, receptores, proteínas de señalización, proteínas de almacenamiento, proteínas de membrana, proteínas transmembrana, proteínas internas proteínas secretoras, proteínas víricas, proteínas nativas, glicoproteínas, proteínas escindidas, proteínas que tienen un enlace disulfuro, complejos de proteínas, proteínas modificadas químicamente y priones.

25 En otra realización más de la presente invención, la molécula biológicamente activa puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos nucleicos, secuencias de ácidos nucleicos codificantes, ARNm, moléculas de ARN antisentido (microARN o ARNip), hidratos de carbono, lípidos y glicolípidos.

30 En otra realización más de la presente invención, la molécula biológicamente activa es un fármaco terapéutico o un compuesto tóxico.

35 Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método de transporte de una molécula biológicamente activa dentro de una célula de un individuo, que incluye administrar una secuencia de aminoácidos unida a una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 15 a 35 en el individuo.

Efectos ventajosos

40 Un MTD modificado de la presente invención tiene una permeabilidad celular considerablemente más excelente de suministro de una molécula biológicamente activa a una célula que un MTD convencional, y mantiene eficazmente una actividad de la molécula biológicamente activa suministrada en la célula. Por consiguiente, el MTD modificado de la presente invención se puede usar en un sistema de suministro de fármacos, una vacuna de proteína recombinante o un fármaco para la terapia de ADN/ARN, métodos para terapias de genes y proteínas, producción de una proteína farmacéutica o medicamento disponible, o una composición fármaco-medicinal o farmacéutica, y también puede ser muy útil en el desarrollo de fármacos nuevos y modificados.

Descripción de las figuras

50 Las FIG. 1 a 4 son resultados del análisis de una estructura secundaria de un MTD modificado de la presente invención usando un programa servidor PEP FOLD.

La FIG. 5 es un resultado del análisis de la permeabilidad celular cuantitativa de un MTD modificado de la presente invención en células de cáncer colorrectal humano mediante citometría de flujo.

55 La FIG. 6 es un resultado del análisis de la permeabilidad celular cuantitativa de un MTD modificado de la presente invención en células de riñón embrionario humano mediante citometría de flujo.

Las FIG. 7 a 9 son resultados de la observación de la permeabilidad celular visible de un MTD modificado de la presente invención en queratinocitos originarios de la piel a través de microscopía confocal láser de barrido; Forma MR: MTD modificado representado por la Fórmula A1-A2-MTD, en la que A1 es metionina y A2 es arginina; Forma MH: MTD modificado representado por A1-A2-MTD, en la que A1 es metionina y A2 es histidina; y forma MK: MTD modificado representado por la Fórmula A1-A2-MTD, en la que A1 es metionina y A2 es lisina.

60 La FIG. 10 es un resultado de la observación de la permeabilidad celular visible de un MTD modificado de la presente invención en células de carcinoma cervical humano a través de microscopía confocal láser de barrido; Forma MR: MTD modificado representado por la Fórmula A1-A2-MTD, en la que A1 es metionina y A2 es arginina; Forma MH: MTD modificado representada por A1-A2-MTD, en la que A1 es metionina y A2 es histidina; y forma MK: MTD modificado representado por la Fórmula A1-A2-MTD, en la que A1 es metionina y A2 es lisina.

65 La FIG. 11 muestra imágenes que muestran la permeabilidad en un tejido celular de un MTD modificado de la

presente invención en modelos de piel EpiOral, tomadas por microscopía confocal láser de barrido.

La FIG. 12 es un resultado de la identificación de la permeabilidad de la piel de un MTD modificado de la presente invención *in vivo* a través de microscopía confocal láser de barrido.

La FIG. 13 es un resultado de la identificación *in vitro* de la permeabilidad celular de un complejo peptídico preparado mediante el acoplamiento de un hexapéptido de acetilo con un MTD modificado de la presente invención a través de microscopía confocal láser de barrido.

La FIG. 14 es una imagen que muestra que un MTD modificado está unido con ARNip de LacZ mediante un enlace covalente.

La FIG. 15 muestra imágenes que muestran la permeabilidad en un tejido pulmonar de un órgano vivo de un MTD modificado de la presente invención inyectado por vía intravenosa en un ratón, tomadas por microscopía confocal láser de barrido.

La FIG. 16 muestra imágenes que muestran que, cuando se inyecta por vía intravenosa un MTD modificado en un ratón, el MTD modificado penetra a través de un tejido pulmonar en un cuerpo vivo, reduciendo así la expresión de las proteínas β -galactosidasa.

Modos de la invención

Mientras que los compuestos sintéticos de bajo peso molecular o los compuestos naturales se pueden introducir fácilmente en las células, las macromoléculas tales como las proteínas, los péptidos y los ácidos nucleicos no penetran a través de una membrana celular, que es una estructura de doble membrana lipídica, debido a sus grandes pesos moleculares. Para superar una deficiencia en la que dichas macromoléculas no penetran a través de una membrana plasmática de una célula, se desarrolló una tecnología de transducción intracelular de macromoléculas (MITT, publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957).

Dado que un dominio de transducción material solo se compone de aminoácidos hidrófobos, cuando se aplica la MITT a hidratos de carbono de carga negativa tales como proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG) y sacáridos cargados negativamente tales como glicosaminoglicanos y ácidos siálicos, la capacidad para aproximarse a una membrana celular que tiene una carga negativa e hidrofiliidad puede ser limitada.

Puesto que un péptido señal en un extremo N-terminal usado en la MITT es un péptido corto que indica el transporte posterior a la traducción de una proteína, una estructura general del péptido señal a diversas proteínas se compone de un dominio anfipático que incluye un codón de partida, M, de la proteína, y una molécula anfipática se compone de dos dominios, por ejemplo, un dominio hidrófilo (polar) y un dominio hidrófobo (no polar). Los inventores esperaban que, teniendo en cuenta la característica anfipática del péptido señal, puesto que las funciones de los dos dominios son evidentes, los inventores estimaron que la continuidad del péptido señal se conservaría bien.

Sin embargo, cuando se continúan aminoácidos cargados positivamente o se acopla una secuencia en la que se incluyen al menos tres aminoácidos cargados positivamente en una secuencia sucesiva o de cinco aminoácidos con un péptido hidrófobo, los inventores estimaron que el péptido hidrófobo no penetraría directamente a través de una membrana celular y sería transducido en una célula, pero sería transducido en una célula a través de endocitosis, como lo hizo el PTD.

Basándose en dichas hipótesis, los inventores proporcionaron un nuevo MTD modificado que suministra más eficazmente una molécula biológicamente activa a una célula aumentando la accesibilidad a una membrana celular que tiene una carga negativa mediante la aplicación de uno o dos aminoácidos hidrófilos (polares) que tienen una carga positiva a un MTD hidrófobo inventado de manera convencional, y de este modo, se completó la presente invención.

La presente invención proporciona un péptido representado por la Fórmula 1, en la que A1 es metionina (M, Met); A2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina (R, Arg), histidina (H, His) y lisina (K, Lys); y un MTD tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1 a 7:

[Fórmula 1] A1-A2-MTD; y

un polinucleótido que codifica el péptido.

El péptido media el transporte de una molécula biológicamente activa dentro de una célula y presenta excelente permeabilidad celular, en comparación con el MTD desvelado en la publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957. En la presente invención, el péptido se denomina "MTD modificado".

El péptido puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 15 a 35, pero la presente invención no se limita a las mismas.

El péptido preferentemente tiene una de las secuencias cuantificadas para permitir una comparación relativa entre 193 MTD desarrollados en la publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957, y la seleccionada cumple, aunque la presente invención no se limita a las mismas, las siguientes condiciones:

1) la prolina está en medio de la secuencia; 2) un valor obtenido evaluando la probabilidad de inducir secreción extracelular usando el programa de señal P con respecto a cada dominio es del 60 % o superior; 3) un índice alifático evaluado usando un programa Protparam (consulte <http://web.expasy.org/protparam/>) está en de 100 a 300; 4) la flexibilidad evaluada usando un programa ProtScale (flexibilidad media) (véase <http://web.expasy.org/protScale/>) es de 0,36 o superior; 5) una hidropatía evaluada usando el programa Protparam es 3,0 o inferior; 6) un índice de inestabilidad evaluado usando el programa Protparam está en de 30 a 60; y 7) una polaridad evaluada usando el programa ProtScale (polaridad) es de 0,1 o superior.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 1 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 8, pero la presente invención no se limita a la misma.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 2 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 9, pero la presente invención no se limita a la misma.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 3 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 10, pero la presente invención no se limita a la misma.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 4 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 11, pero la presente invención no se limita a la misma.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 5 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 12, pero la presente invención no se limita a la misma.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 6 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 13, pero la presente invención no se limita a la misma.

La secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 7 se puede codificar con la secuencia polinucleotídica de SEQ. ID. NO: 14, pero la presente invención no se limita a la misma.

El polinucleótido de la presente invención puede ser un tipo de ARN o ADN, y el ADN incluye ADNc y ADN sintético. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario. Si el ADN es monocatenario, puede ser una cadena codificante o una cadena no codificante (antisentido). La secuencia codificante puede ser la misma que una secuencia de bases seleccionada de SEQ. ID. NO: 36 a 56, o una secuencia codificante diferente. Las secuencias codificantes se obtienen por degeneración o redundancia de códigos genéticos, y codifican los mismos polipéptidos.

El polinucleótido de la presente invención también incluye una variante del polinucleótido descrito anteriormente, que codifica un fragmento, análogo o derivado del polinucleótido caracterizado por secuencias de aminoácidos deducidas de la SEC. ID. NO: 15 a 35. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica generada de manera natural del polinucleótido o una variante no generada de manera natural del polinucleótido.

El polinucleótido de la presente invención puede tener una variante alélica generada de manera natural de una secuencia codificante caracterizada por una secuencia de bases seleccionada de SEQ. ID. NO: 36 a 56. La variante alélica es una forma alternativa de una secuencia polibase que tiene sustitución, eliminación o adición de al menos un nucleótido, sin cambio sustancial en una función de un polinucleótido codificado.

Es bien conocido en la técnica que un único aminoácido puede ser codificado por al menos un codón nucleotídico, y el polinucleótido puede ser fácilmente modificado para fabricar un polinucleótido alternativo que codifique el mismo péptido. Por consiguiente, en otra realización de la presente invención, el polinucleótido incluye una secuencia de bases alternativa que codifica un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente. Una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos reivindicada incluye la secuencia reivindicada y una secuencia de bases que codifica una combinación arbitraria de aminoácidos arbitrarios ubicados en un extremo N-terminal o un extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos reivindicada.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de ingeniería genética de una molécula biológicamente activa para que tenga permeabilidad celular usando el MTD modificado.

Un uso terapéutico de la molécula biológicamente activa suele estar limitado por la baja permeabilidad celular. Aunque se ha demostrado que las moléculas biológicamente activas son absorbidas por células a través de un proceso endocítico intracelular, las moléculas que entran en la célula de esta manera normalmente son atrapadas en una vesícula endocítica intracelular y degradadas en los lisosomas.

El MTD modificado de la presente invención parece tener una permeabilidad celular más eficaz que un MTD convencional. El MTD modificado de la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit, que incluye componentes requeridos conocidos por un experto en la materia para facilitar la unión de un péptido a un polipéptido diana. Posteriormente, se puede suministrar una proteína diana unida al MTD modificado de esta manera *in vitro* o *in vivo* a la célula para la endocitosis intracelular.

El polinucleótido descrito anteriormente se puede insertar en un vector de expresión de proteínas para producir una proteína que se pueda suministrar a una célula desde un exterior de la misma a través de la acción del MTD modificado anteriormente descrito.

5 Se modifica genéticamente un vector de expresión para incorporar una secuencia de ácido nucleico que codifica un MTD en una orientación bien N-terminal y/o C-terminal en una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido, polipéptido, dominio proteico o proteína de longitud completa de interés como una molécula biológicamente activa, y en el marco de lectura correcto de modo que se pueda expresar una proteína recombinante que consista en el dominio de transducción macromolecular y la molécula biológicamente activa diana. Los vectores de expresión
10 pueden escogerse entre aquellos fácilmente disponibles para su uso en sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

Como se usa en la presente invención, un MTD es un dominio de transducción macromolecular que dirige el transporte intracelular de una proteína diana desde el exterior hacia el interior de una célula, y el MTD modificado
15 tiene una permeabilidad celular mejor que la del MTD convencional. En otra realización de la presente invención, el MTD modificado puede incluir una secuencia alternativa que media la importación de un péptido o un polipéptido en una célula a través de una membrana celular.

Una proteína diana es una proteína que normalmente presenta una permeabilidad inferior a la óptima a través de la membrana celular, pero que, cuando está unida N-terminal y/o C-terminalmente al MTD modificado de la presente
20 invención, se transporta desde el exterior hasta el interior de la célula.

La proteína diana puede tener un sitio de escisión entre el MTD modificado y el polipéptido diana, el dominio proteico o la proteína de longitud completa, y el sitio de escisión puede ser, como alternativa, un sitio del factor X u otro sitio que es conocido por un experto habitual en la materia relacionada con la escisión de la proteína recombinante para
25 eliminar físicamente el MTD modificado del péptido o polipéptido en cuestión.

Como se usa en la presente invención, la expresión "molécula biológicamente activa" incluye cualquier molécula que, si se importa a una célula, es capaz de presentar un efecto biológico. Debido a que las proteínas muy grandes que tienen pesos moleculares que varían de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1 millón son exportadas por células (por ejemplo, anticuerpos, fibrinógeno y macroglobulina), se pueden importar proteínas muy grandes a las células mediante el método de la presente invención.
30

Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero sin limitación, proteínas, polipéptidos y péptidos, que incluyen dominios funcionales de moléculas biológicamente activas, tales como factores de crecimiento, enzimas, factores de transcripción, toxinas, péptidos antigénicos (para vacunas), anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Los ejemplos adicionales de moléculas biológicamente activas incluyen ácidos nucleicos, tales como plásmidos, secuencias de ácidos nucleicos codificantes, moléculas de ARNm y ARN antisentido, hidratos de carbono, lípidos y glicolípidos. Otros ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen aquellas para
35 diagnosticar, tratar y/o prevenir una enfermedad, en particular, aquellas con baja permeabilidad de la membrana celular. Algunos ejemplos de estos agentes terapéuticos incluyen fármacos contra el cáncer, tales como Daunorubicina, y productos químicos tóxicos que, debido a la dosis más baja que se puede usar cuando se administran mediante este método, ahora se pueden administrar con mayor seguridad. Otro ejemplo más de una molécula biológicamente activa es un péptido antigénico. Los péptidos antigénicos se pueden administrar para proporcionar protección inmunológica cuando son importados por células implicadas en la respuesta inmune. Otros ejemplos incluyen péptidos inmunosupresores (por ejemplo, péptidos que bloquean los linfocitos T autorreactivos, que se conocen en la técnica). Otros numerosos ejemplos serán evidentes para el experto en la materia.
40
45

Los ejemplos representativos de la molécula biológicamente activa adecuada para la presente invención pueden incluir enzimas, hormonas, proteínas de transporte, inmunoglobulina o anticuerpos, proteínas estructurales, proteínas de función motora, receptores, proteínas de señalización y proteínas de almacenamiento en términos de su función; y proteínas de membrana o transmembrana, proteínas internas, proteínas externas o secretas, proteínas víricas, proteínas nativas, glicoproteínas, proteínas escindidas, proteínas con enlaces disulfuro, complejos proteicos, proteínas modificadas químicamente y priones en cuanto a su ubicación y funciones.
50
55

Se pueden usar los métodos de ácido nucleico recombinante convencionales para expresar una proteína recombinante modificada genéticamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica el MTD modificado de la presente invención se puede clonar en un vector de expresión de ácido nucleico que tiene secuencias de señalización y procesamiento adecuadas, y secuencias reguladoras para la transcripción y traducción, y se puede sintetizar una proteína usando un método de síntesis orgánica automatizado. En la bibliografía, se describen métodos para sintetizar una proteína, por ejemplo, ["Methods in Enzymology", Volumen 289: "Solid-Phase Peptide Synthesis" por Gregg B. Fields (Editor), Sidney P. Colowick, Melvin I. Simon (Editor) Academic Press (1997)].
60
65

Para obtener una expresión de alto nivel de un gen clonado o un ácido nucleico, tal como un ADNc codificante de un péptido MTD, normalmente se subclona una secuencia de MTD en un vector de expresión que contiene un fuerte promotor para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción y, en el caso de un ácido nucleico

que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la materia y se desvelan en la bibliografía [Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", edición en 3D, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); y Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N. Y. (1989)]. Los sistemas de expresión bacteriana para expresar el MTD modificado de la presente invención están disponibles en, por ejemplo, *E. Coli*, *Bacillus* sp., y *Salmonella* (Palva *et al.*, *Gene* 22: 229-235 (1983), Mosbach *et al.*, *Nature* 302: 543-545 (1983)). Los kits para dichos sistemas de expresión se encuentran disponibles en el mercado. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamífero, levadura y células de insecto son bien conocidos en la materia y también se encuentran disponibles en el mercado. En otra realización de la presente invención, el vector de expresión eucariota puede ser un vector adenovírico, un vector adeno-asociado o un vector retroviral.

En general, el vector de expresión para expresar la proteína recombinante permeable a las células preparado mediante la unión de una proteína a un extremo N-terminal, a un extremo C-terminal o a ambos extremos del MTD modificado puede incluir secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor unido operativamente a una secuencia que codifica el dominio de transducción de macromoléculas.

Los ejemplos no limitantes de promotores inducibles que se pueden usar incluyen promotores que responden a hormonas esteroideas (por ejemplo, promotores sensibles a ecdisona, sensibles a estrógenos y sensibles a glucocorticoides), los sistemas de tetraciclina "Tet-On" y "Tet-Off", y promotores sensibles a los metales. La construcción se puede introducir en una célula hospedadora apropiada, por ejemplo, una célula bacteriana, célula de levadura, célula de insecto o célula de cultivo de tejido. La construcción también se puede introducir en células madre embrionarias para generar un organismo transgénico como sujeto modelo. Hay un gran número de vectores y promotores adecuados que son conocidos por los expertos en la materia y que se encuentran disponibles en el mercado para generar las construcciones recombinantes de la presente invención.

Se pueden usar métodos conocidos para construir vectores que contienen el polinucleótido de la presente invención y señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Por ejemplo, dichas técnicas se desvelan en la bibliografía [Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (2001); y Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)].

Las células hospedadoras adecuadas para producir una proteína recombinante permeable a las células incluyen células bacterianas y células eucariotas (por ejemplo, células de hongos, insectos, plantas y mamíferos). Las células hospedadoras pueden ser interrumpidas por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica o el uso de agentes de lisis celular. La bibliografía [Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice", Nueva York: Springer-Verlag (1994)] desvela una serie de métodos generales para purificar proteínas recombinantes (y no recombinantes). Los métodos pueden incluir, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad, precipitación selectiva, diálisis y cromatografía de interacción hidrófoba. Estos métodos pueden adaptarse para idear una estrategia de purificación para la proteína recombinante permeable a las células. Si la proteína recombinante permeable a las células incluye un mango de purificación, tal como un marcador de epítipo o una secuencia quelante de metales, se puede usar cromatografía de afinidad para purificar la proteína en gran medida.

La cantidad de proteína producida puede evaluarse detectando directamente el dominio de transducción macromolecular (por ejemplo, usando análisis Western) o indirectamente (por ejemplo, ensayando materiales de las células para determinar la actividad específica de unión a ADN, tal como mediante el ensayo de cambio de movilidad electroforética). Las proteínas pueden detectarse antes de la purificación, durante cualquier etapa de purificación o tras la purificación. En algunas implementaciones, puede que no sea necesaria la purificación o la purificación completa.

Las proteínas recombinantes modificadas genéticamente preparadas mediante el método de la presente invención son proteínas permeables a las células y se pueden usar como vacunas basadas en proteínas, particularmente en caso de que las vacunas de organismos enteros muertos o atenuados sean inviables. Las proteínas permeables a las células preparadas mediante el método de la presente invención también se pueden usar para el tratamiento de diversas enfermedades, en particular, una enfermedad inmune o un cáncer. Las proteínas permeables a las células se pueden suministrar al interior de la célula, eliminando la necesidad de transfectar o transformar la célula con un vector recombinante. Las proteínas permeables a las células de la presente invención se pueden usar *in vitro* para investigar la función de la proteína o se pueden usar para mantener las células en un estado deseado.

El MTD modificado de la presente invención se puede usar para suministrar péptidos, polipéptidos, dominios de proteínas o proteínas al interior de una célula diana bien *in vitro* o *in vivo*. El MTD modificado puede unirse a la proteína diana a través de un enlace peptídico formado por la expresión de la proteína recombinante a partir de una molécula de ADN o ARN recombinante, o puede unirse a la proteína diana por medio de un enlazador unido covalentemente al MTD. Se puede usar un enlace covalente para unir el MTD modificado de la presente invención a una molécula no proteica, tal como un polinucleótido, para su importación a la célula.

El método de obtención por ingeniería genética de proteínas con permeabilidad de la membrana celular de acuerdo con la presente invención proporciona un medio de suministro de productos proteicos terapéuticos a una célula. La combinación de la presente invención con métodos previamente descritos de suministro de proteínas extracelulares proporciona un método de suministro de proteínas para su importación a una célula en una forma funcional estabilizada de una manera de liberación controlada.

Los polipéptidos se producen usando un vector de expresión y un sistema de expresión apropiados. La permeabilidad celular se confiere a la proteína o al polipéptido mediante la expresión de una proteína recombinante con el MTD situado en el extremo N-terminal y/o C-terminal al polipéptido expresado. Las proteínas menos estables se estabilizan mediante métodos conocidos por un experto en la materia y descritos anteriormente. El suministro al medio extracelular se consigue proporcionando la proteína recombinante estabilizada en un vehículo apropiado, tal como vehículos de microesferas. La proteína de elección determinará el vector y el sistema de expresión apropiados, así como las técnicas de estabilización y de suministro apropiadas. Un experto habitual en la materia de los sistemas de suministro de fármacos puede escoger las técnicas apropiadas entre las descritas.

Como se usa en la presente invención, la expresión "membrana celular" se refiere a una barrera que contiene lípidos que separa las células o los grupos de células del espacio extracelular. Las membranas celulares incluyen, pero sin limitación, membranas plasmáticas, paredes celulares, membranas de orgánulos intracelulares, tales como membrana mitocondrial, membranas nucleares, y similares.

Como se muestra en la presente invención, la expresión "molécula biológicamente activa" se refiere a compuestos o moléculas que son capaces de generar o modificar una respuesta biológica en un sistema. Los ejemplos no limitantes de moléculas biológicamente activas incluyen anticuerpos (por ejemplo, monoclonales, quiméricos, humanizados, etc.), colesterol, hormonas, antivíricos, péptidos, proteínas, quimioterapéuticos, moléculas pequeñas, vitaminas, cofactores, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos formadores de triplex, quimeras 2,5-A, ANip, ARNip, ARNim, inhibidores de ARNi, ARNbc, aloenzimas, aptámeros, señuelos y análogos de los mismos. Las moléculas biológicamente activas de la invención también incluyen moléculas capaces de modular la farmacocinética y/o la farmacodinámica de otras moléculas biológicamente activas, por ejemplo, lípidos y polímeros tales como poliaminas, poliamidas, polietilenglicol y otros poliéteres. En ciertas realizaciones, la expresión "molécula biológicamente activa" se usa indistintamente con el término "macromolécula".

Como se usa en la presente invención, el término "macromolécula" se refiere a moléculas grandes (peso molecular superior a 1000 Da) ilustradas por, pero sin limitación, péptidos, proteínas, y oligonucleótidos y polinucleótidos de origen biológico o sintético.

Como se usa en la presente invención, el término "péptido" se refiere a un compuesto que se compone de una sola cadena de D- o L-aminoácidos o una mezcla de D- y L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Preferentemente, los péptidos contienen al menos dos restos de aminoácidos y tienen una longitud inferior a aproximadamente 50 aminoácidos.

Como se usa en la presente invención, el término "proteína" se refiere a un compuesto que se compone de aminoácidos dispuestos linealmente unidos por enlaces peptídicos, pero, al contrario de los péptidos, tiene una configuración bien definida. Las proteínas, a diferencia de los péptidos, contienen preferentemente cadenas de 50 o más aminoácidos.

Como se usa en la presente invención, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de al menos dos restos de aminoácidos y que contiene uno o más enlaces peptídicos. Los polipéptidos abarcan péptidos y proteínas, independientemente de si el polipéptido tiene una configuración bien definida.

Como se usa en la presente invención, el término "ácido nucleico" se refiere a oligonucleótidos o polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), así como análogos de ARN o ADN, por ejemplo, preparados a partir de análogos de nucleótidos, estando cualquiera de ellos en forma monocatenaria o bicatenaria.

Los restos de aminoácidos se denominan en el presente documento por sus anotaciones convencionales de una letra o de tres letras, o por sus nombres completos: A, Ala, alanina; C, Cys, cisteína; D, Asp, ácido aspártico; E, Glu, ácido glutámico; F, Phe, fenilalanina; G, Gly, glicina; H, His, histidina; I, Ile, isoleucina; K, Lys, lisina; L, Leu, leucina; M, Met, metionina; N, Asn, asparagina; P, Pro, prolina; Q, Gln, glutamina; R, Arg, arginina; S, Ser, serina; T, Thr, treonina; V, Val, valina; W, Trp, triptófano; X, Hyp, hidroxiprolina; e Y, Tyr, tirosina.

Como se usa en la presente invención, la expresión "dominio de transducción macromolecular (MTD)" se refiere a un péptido que facilita el transporte de macromoléculas dentro de una célula.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Aunque también se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales específicos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para desvelar y describir los métodos y/o los materiales en relación con los que se citan en las publicaciones. Debe tenerse en cuenta que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En una realización ilustrativa de la presente invención, los inventores demostraron que una característica estructural de un dominio de transducción macromolecular (MTD) desvelado en la patente anterior relativa a un péptido permeable a células derivado de un péptido señal (publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957: "NOVEL MACROMOLECULE TRANSDUCTION DOMAINS AND METHODS FOR IDENTIFICATION AND USES THEREOF") no se destruye usando una secuencia fusionada con una secuencia N-terminal de una proteína fluorescente EGFP mediante un programa de servicio de servidor PEP FOLD, que puede verificarse en línea (véanse las FIG. 1 a 4).

En otra realización ilustrativa de la presente invención, se preparó un complejo formado mediante la unión de un material fluorescente FITC a un MTD para determinar cuantitativamente la permeabilidad celular del péptido MTD, y las células se trataron con el péptido FITC-MTD y luego se analizaron usando un citómetro de flujo. Como resultado de ello, se mostró una señal fluorescente más alta en un MTD modificado de la presente invención, en comparación con el MTD convencional, y además, se demostró un efecto de penetración del MTD modificado en una célula confirmando que el MTD suministró de manera más eficaz el FITC a las células que un dominio de transducción de proteínas (PTD).

En otra realización ilustrativa más de la presente invención, se visualizaron la permeabilidad celular y la ubicación intracelular usando un complejo preparado mediante la unión de un material fluorescente FITC a un MTD a través de microscopía confocal. Como resultado de ello, se mostró una permeabilidad celular en el MTD modificado superior a la del MTD convencional, que era igual al resultado de la citometría de flujo, y también se confirmó que la permeabilidad celular era superior en el MTD que en el PTD.

Además, en otra realización ilustrativa más de la presente invención, se administró el ARNip-Cy3 de LacZ fusionado con MTD2173A por vía intravenosa a ratones para visualizar la permeabilidad del tejido pulmonar a través de microscopía confocal, y se confirmó una reducción de la producción de proteína β -galactosidasa expresada sistemáticamente en un ratón mediante ARNip de LacZ mediante la observación de un tejido de un pulmón enucleado teñido con X-gal usando un microscopio, lo que demuestra la penetración a largo plazo del MTD modificado en el tejido.

De aquí en adelante, en el presente documento, se presentarán ejemplos ilustrativos para ayudar a comprender la presente invención. Sin embargo, los siguientes ejemplos simplemente se proporcionan de manera que la presente invención de pueda comprender de manera más completa, no para limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1. Selección de péptido MTD para inventar MTD modificado

Los inventores seleccionaron una secuencia de un MTD diana para aumentar la capacidad de transducción en una secuencia que cumpla las siguientes condiciones de secuencias cuantificadas para la comparación relativa entre 193 MTD desarrollados en la publicación de patente coreana n.º 110-2009-0103957, que es la tecnología previamente desarrollada por los inventores.

Las condiciones para la selección son las siguientes:

- 1) Entre las secuencias del dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD en la que la prolina estaba situada en el medio.
- 2) Entre secuencias del dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD que tenía una alta capacidad de inducción de la secreción extracelular.
- 3) Entre las secuencias de dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD que cumplía un nivel específico de un índice alifático, que es un factor que determina las características fisicoquímicas del MTD.
- 4) Entre las secuencias de dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD que cumplía un nivel específico de flexibilidad, que es un factor que determina las características fisicoquímicas del MTD.
- 5) Entre las secuencias del dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD que cumplía un nivel específico de hidropatía, que es un factor que determina las características fisicoquímicas del MTD.
- 6) Entre las secuencias del dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD que cumplía un nivel específico de un índice de inestabilidad, que es un factor que determina las características fisicoquímicas del MTD.
- 7) Entre las secuencias del dominio de transducción macromolecular, se seleccionó una secuencia de MTD que

cumplía un nivel específico de polaridad, que es un factor que determina las características fisicoquímicas del MTD.

Las condiciones anteriormente descritas se describirán con detalle.

5 Para explorar una secuencia representativa específica, como se describirá en la Etapa 1), se determinó una secuencia representativa basada en la presencia y la posición de la prolina.

10 Entre la alanina, valina, prolina, leucina e isoleucina, que son aminoácidos que constituyen una secuencia del MTD, la prolina, que tiene una secuencia de cadena lateral corta y un tamaño pequeño, tiene una influencia sobre un grado de libertad para formar una estructura secundaria del aminoácido, y contribuye a la permeación del MTD a través de una membrana celular. Entre los MTD desvelados en la publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957, titulada "NOVEL MACROMOLECULE TRANSDUCTION DOMAINS AND METHODS FOR IDENTIFICATION AND USES THEREOF", se determinaron 49 MTD que tenían una prolina en mitad de su

15 secuencia de aminoácidos, y así se clasificaron por tener un alto grado de libertad para formar una estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos.

Posteriormente, en el MTD seleccionado en la Etapa 1), se seleccionó una secuencia que tenía una alta probabilidad de secreción extracelular. Algunas proteínas hidrosolubles tienen una señal que puede interactuar con un receptor que media el transporte, y en el transporte mediado por señal, la proteína tiene una o más secuencias señal que indican una diana suministrada. Por consiguiente, suponiendo que una mayor similitud con la secuencia inductora de la secreción extracelular puede mejorar la capacidad de transducción, se evaluó la capacidad de inducción de la secreción extracelular usando un programa de Señal P. Se evaluó la probabilidad entre el 10 y 90 % con respecto a cada dominio y, en el MTD determinado en la Etapa 1), se seleccionó una secuencia evaluada con una probabilidad

20 del 60 % o superior como una secuencia diana modificada.

Posteriormente, en el MTD seleccionado en la Etapa 2), según lo descrito en la Etapa 3), se seleccionó una secuencia que cumplía un nivel específico de un índice alifático, que es un factor que determina una característica fisicoquímica del MTD. El índice alifático es una característica física que determina el volumen total de una molécula determinada por una cadena de átomos de carbono de una cadena lateral de aminoácidos, y se evalúa como una característica de la modificación de una estructura de la membrana celular. El índice alifático está determinado por un valor original de cada secuencia de aminoácidos del MTD y una media de la secuencia total usando un programa Protparam (véase <http://web.expasy.org/protparam/>). El programa Protparam es una herramienta útil para visualizar una característica física de una proteína o péptido compuesto de aminoácidos, y se seleccionó una secuencia

30 evaluada para tener un índice alifático de 100 a 300 como secuencia representativa para mejorar la capacidad de transducción.

Posteriormente, en el MTD seleccionado en la Etapa 3), según lo descrito en la Etapa 4), se seleccionó una secuencia que cumplía un nivel específico de flexibilidad, que es un factor que determina una característica fisicoquímica del MTD. La flexibilidad es una característica fisicoquímica que se refiere a la correlación entre un aminoácido de un extremo N-terminal y un aminoácido de un extremo C-terminal del MTD, y un grado de libertad, y proporciona flexibilidad estructural, y tiene que ver con la afinidad a la membrana celular. La flexibilidad se evaluó de acuerdo con una longitud de la secuencia de aminoácidos y una construcción de una secuencia de cadena lateral del aminoácido, usando un programa ProtScale (flexibilidad media) (véase <http://web.expasy.org/protscale/>). El programa ProtScale se usó como una herramienta para digitalizar las características físicas de una proteína o un péptido compuesto de aminoácidos, y entre los MTD determinados en la Etapa 3), se seleccionó una secuencia que tenía una flexibilidad de 0,36 o superior, que se evaluó usando el programa ProtScale (flexibilidad media) como una secuencia representativa para mejorar la capacidad de transducción.

40

45

Posteriormente, en el MTD seleccionado en la Etapa 4), según lo descrito en la Etapa 5), se seleccionó una secuencia que cumplía un nivel específico de hidropatía, que es un factor que determina una característica fisicoquímica del MTD. La hidropatía es una característica fisicoquímica determinada por una característica original de un aminoácido y considerada como una característica que determina una propiedad física, y se sabe que se produce una aglomeración grave cuando la hidropatía es de 3,0 o superior. Además, la hidropatía se determinó por un valor original del aminoácido del MTD y una media de la secuencia total, y se evaluó usando el programa Protparam. Por consiguiente, se determinó una secuencia que tenía una hidropatía de 3,0 o inferior en el MTD seleccionado en la Etapa 4) de los resultados de la evaluación para la hidropatía con un valor de entre 1,3 y 3,9 como una secuencia representativa para la modificación.

50

55

Posteriormente, en el MTD seleccionado en la Etapa 5), según lo descrito en la Etapa 6), se determinó una secuencia que cumplía un nivel específico de un índice de inestabilidad de dominios de transducción macromolecular. El índice de inestabilidad es una característica que indica la estabilidad de una secuencia de aminoácidos, determinada por un orden de ordenación de los aminoácidos en la secuencia, y a medida que aumenta el índice de inestabilidad, la inestabilidad también aumenta. El índice de inestabilidad es un factor determinante de las características fisicoquímicas del MTD, considerado como una característica que tiene una influencia sobre la estabilidad intracelular del dominio, y evaluado usando el programa Protparam. Por consiguiente, entre los MTD que

60

65

tienen un índice de inestabilidad de 0 a 130, se seleccionó una secuencia que tenía una inestabilidad de 30 a 60 en el MTD determinado en la Etapa 5) como una secuencia representativa para la modificación.

Posteriormente, en el MTD seleccionado en la Etapa 6), según lo descrito en la Etapa 7), se determinó una secuencia que cumplía un nivel específico de polaridad del MTD, que es un factor que determina una característica fisicoquímica del MTD. La polaridad es una escala que muestra la afinidad con el agua, que está determinada por una longitud de una cadena de átomos de carbono de componentes de un aminoácido y la presencia de un grupo hidróxido. La polaridad es una característica que determina una propiedad física del MTD, así como la hidropatía, y se considera que tiene una influencia en la afinidad hacia la membrana celular. La polaridad se determina por un valor original del aminoácido del MTD y una media de la secuencia total, y se evalúa usando el programa Protoscale (polaridad). Por consiguiente, entre los MTD determinados en la Etapa 6), se seleccionó una secuencia evaluada para tener una polaridad de 0,1 o superior usando el programa Protoscale (polaridad) como una secuencia representativa para la modificación.

En particular, se determinó mediante el siguiente procedimiento un MTD diana, JO-103 (SEQ ID NO: 3), para inventar un MTD modificado entre los MTD desvelados en la publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957.

- i) JO-103 de los MTD conocidos por la publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957, titulada "NOVEL MACRO-MOLECULE TRANSDUCTION DOMAINS AND METHODS FOR IDENTIFICATION AND USES THEREOF", se componía de una secuencia de LALPVLLLA;
- ii) tenía una probabilidad del 90 % en la evaluación de la probabilidad de secreción extracelular usando un programa de señal P;
- iii) tenía un índice alifático de 271, determinado usando el programa Protparam;
- iv) tenía una flexibilidad de 0,38, determinada usando el programa Protoscale;
- v) tenía una hidrofobicidad de 2,8, determinada usando el programa Protparam;
- vi) tenía un índice de inestabilidad de 52, determinado usando el programa Protparam; y
- vii) tenían una polaridad de 0,13, determinada usando el programa Protoscale.

Por lo tanto, se sabe que JO-103 determinado como la secuencia diana para mejorar la capacidad de transducción es un dominio diana que satisface el total de las 7 etapas.

A través del mismo método, se seleccionaron cinco MTD diana para inventar un MTD modificado, y en particular, los MTD diana seleccionados fueron MTD JO-018 (SEQ ID NO: 1), MTD JO-067 (SEQ ID NO: 2), MTD JO-103 (SEQ ID NO: 3), MTD JO-159 (SEQ ID NO: 4) y MTD JO-173 (SEQ ID NO: 5).

Se garantizó flexibilidad adicional cambiando la posición de la prolina de MTD JO-173; y se fabricó un péptido intermedio, MTD 173A (SEQ ID NO: 7). Dado que el MTD 173A fabricado de dicha manera cumplía todas las condiciones de selección de las 7 etapas, también se incluyó en la secuencia de MTD diana para inventar un MTD modificado.

Además, para JO-18 de los MTD seleccionados como dianas, se sustituyó una secuencia con un aminoácido que tenía una baja hidropatía, deduciendo así el péptido intermedio, MTD 18m (SEQ ID NO: 6), para mejorar una propiedad física. El MTD 18m también cumplía las condiciones de selección de 7 etapas y, por lo tanto, también se incluyó en la secuencia de MTD diana para inventar un MTD modificado.

Ejemplo 2. Invención del MTD modificado

Para los 7 MTD diana seleccionados en el Ejemplo 1, se añadieron de 1 a 2 aminoácidos hidrófilos (polares) para su aplicación a un dominio hidrófobo, aumentando así la accesibilidad a una membrana celular, y produciendo de este modo un nuevo MTD modificado que suministraba de manera más eficaz una molécula biológicamente activa a una célula y, por lo tanto, se inventó un péptido representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1] A1-A2-MTD;

En este caso, A1 es metionina (M, Met); A2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina (R, Arg), histidina (H, His) y lisina (K, Lys), que están cargados positivamente; y MTD es una secuencia de 7 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1 a 7 seleccionadas en el Ejemplo 1.

La secuencia del MTD modificado inventada a través de la Fórmula 1 es la misma que una de las secuencias de aminoácidos descritas en SEQ. ID. NO: 15 a 35, y se sintetiza un péptido basado en la secuencia de aminoácidos inventada, confirmando así la permeabilidad celular.

Ejemplo 3. Análisis de la estructura secundaria del MTD modificado

Se analizó una estructura secundaria del MTD modificado inventado en el Ejemplo 2 usando un programa de servidor PEP FOLD.

Como resultado de ello, como se muestra en las FIG. 1 a 4, se confirmó que el MTD modificado inventado en el Ejemplo 2 no dañó una característica estructural del MTD desvelado en la publicación de patente coreana n.º 10-2009-0103957, titulada "NOVEL MACROMOLECULE TRANSDUCTION DOMAINS AND METHODS FOR IDENTIFICATION AND USES THEREOF" y mantuvo una estructura de α -hélice aumentando la permeabilidad de la membrana celular.

Ejemplo 4. Síntesis del MTD modificado

Se realizó la síntesis del MTD modificado diseñado en el Ejemplo 2 mediante el acoplamiento uno a uno a partir del extremo C-terminal usando la síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc (SPPS).

En particular, en primer lugar, se usó una resina a la que se unió el primer aminoácido en el extremo C-terminal de un péptido. La resina disponible se usó en la síntesis seleccionando una resina adecuada seleccionada entre una resina de NH_2 -Lys(Dde)-2-cloro-tritilo, una resina de NH_2 -Met-2-cloro-tritilo o una resina de NH_2 -Ser(tBu)-2-cloro-tritilo cuando era necesario.

En segundo lugar, se usaron todos los materiales aminoacídicos, en los que se protegieron los extremos N-terminales con Fmoc y los restos se protegieron con Trt, Boc, t-Bu, etc. que se eliminaron de todos los ácidos para sintetizar el péptido (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(t-Bu)-OH, Fmoc-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Met-OH).

En tercer lugar, se eliminó Fmoc mediante una reacción realizada dos veces usando piperidina al 20 % en DMF a temperatura ambiente durante 5 minutos.

En cuarto lugar, se lavaron DMF, MeOH, MC y DMF secuencialmente.

En quinto lugar, para aislar el péptido sintetizado de la resina y eliminar los grupos protectores del resto, se usó TFA/EDT/Tioanisol/TIS/ H_2O = 90/2,5/2,5/2,5/2,5 (TFA = ácido trifluoroacético, EDT = 1,2-etanoditiol, TIS = triisopropilsilano). Finalmente, tras la purificación a través de HPLC, se realizó la identificación usando un espectrómetro de masas, y se realizó la liofilización, mediante lo que se obtuvo un MTD modificado.

Además, para sintetizar un MTD unido a material fluorescente (FITC), tras realizarse la síntesis de MTD mediante el método de síntesis descrito anteriormente, se añadió finalmente una lisina (K) para realizar la síntesis de péptidos y, a continuación, se unió el FITC a un resto de amina libre de la lisina. Se aisló el MTD-FITC sintetizado de la resina y se purificó por HPLC, y se identificó un peso molecular del péptido mediante un espectrómetro de masas y se liofilizó, preparando de este modo un MTD-FITC. Tras ello, se disolvió el MTD-FITC modificado sintetizado en agua destilada estéril hasta una concentración de 1 mM en un estado de protección contra la luz, se dispensó en una pequeña cantidad en un recipiente de centrifugación de 1,5 ml y se almacenó en congelación hasta que se usó.

Ejemplo 5. Identificación de la permeabilidad celular *in vitro* de MTD modificado usando citometría de flujo

Para identificar la permeabilidad celular *in vitro* del MTD modificado de la presente invención y un MTD convencional (un MTD diana modificado), se usó citometría de flujo.

En particular, tras marcar 1, 5 o 10 μM de MTD con FITC, se usó la muestra sintetizada para tratar un cáncer de colon humano (HCT116, n.º de catálogo: CCL-247, ATCC, EE.UU.) y se cultivó durante 4 horas. Se cultivaron las células HCT116 en un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS) y penicilina/estreptomina al 1 % (10.000 unidades de penicilina y 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, Invitrogen) en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 a 37 °C. Una vez completado el cultivo, se trató con tripsina para eliminar el MTD-FITC libre expuesto a una membrana celular de la célula HCT116 con la que se trató cada muestra, y las células resultantes se lavaron tres veces con tampón fosfato frío.

Se recuperaron las células lavadas y se aplicaron a un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (FACS Calibur, Beckton-Dickinson, San Diego CA, EE.UU.). Por cada muestra, las células (1×10^4) se analizaron usando el software de análisis de citometría CellQuest Pro para realizar una comparación cuantitativa y un análisis de la permeabilidad celular del MTD-FITC modificado y el MTD-FITC convencional.

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 5, y en particular, en la FIG. 5 que muestra los resultados de la citometría de flujo, la curva gris indica la permeabilidad celular de células individuales, la curva verde indica la permeabilidad celular de un grupo tratado con concentración 1 μM , la curva naranja indica la permeabilidad celular de un grupo tratado con concentración 5 μM y la curva roja indica la permeabilidad celular de un grupo tratado con concentración 10 μM .

Como se muestra en la FIG. 5, se vio que, comparando los medios geométricos de 10 μM de MTD-FITC, el MTD modificado tenía una señal fluorescente alta de un mínimo del 140 % a un máximo del 270 % del MTD convencional, e incluso se aumentó una baja concentración del MTD modificado en la permeabilidad celular en un nivel similar al

de una alta concentración del MTD convencional.

Por consiguiente, se observó que el MTD modificado inventado para la presente invención se había mejorado considerablemente en cuanto a la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula, en comparación con el MTD convencional.

Ejemplo 6. Identificación de la permeabilidad celular *in vitro* del MTD modificado usando citometría celular de flujo (célula HEK293)

Además, para las células HEK293 derivadas de células renales embrionarias humanas, se identificó la permeabilidad celular *in vitro* mediante citometría celular de flujo. Como controles, se usaron muestras preparadas mediante la unión de FITC al MTD modificado de la presente invención y al MTD previamente conocido, un péptido desordenado que se considera que tiene una baja permeabilidad celular y permeabilidad celular, y una secuencia de transducción macromolecular derivada de kFGF4 (MTS) que tenía permeabilidad celular previamente investigada.

En particular, se trataron con 5 μM de la muestra células renales embrionarias humanas (HEK293), y se cultivaron durante 6 horas. Se cultivaron las células HEK293 en un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS) y penicilina/estreptomicina al 1 % (10.000 unidades de penicilina y 10.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, Invitrogen) en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5 % a 37 °C. Una vez completado el cultivo, se trató con tripsina para eliminar el MTD-FITC libre expuesto a una membrana celular de la célula HCT116 tratada con cada muestra, y las células resultantes se lavaron tres veces con tampón fosfato frío.

Se recuperaron las células lavadas y se aplicaron a un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (FACS Calibur, Beckton-Dickinson, San Diego CA, EE.UU.). Por cada muestra, las células (1×10^4) se analizaron usando el software de análisis de citometría CellQues Pro para realizar una comparación cuantitativa y un análisis de la permeabilidad celular del MTD-FITC modificado y el MTD-FITC de la técnica anterior.

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 6, y como resultado, se confirmó que un péptido JO-103 MTD que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 3 se mejoró en cuanto a la permeabilidad celular del 150 al 190 % tras la modificación, y un péptido JO-159 MTD que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 4 se mejoró en cuanto a la permeabilidad celular del 180 al 210 % tras la modificación. Además, en el caso de un péptido MTD preparado mediante la modificación de un péptido JO-173A MTD que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 7, se confirmó que la permeabilidad celular se había mejorado hasta un 190-230 %.

Por consiguiente, se observó que el MTD modificado inventado para la presente invención tenía una permeabilidad celular considerablemente mejor, en comparación con el MTD convencional.

Ejemplo 7. Identificación de la permeabilidad celular *in vitro* del MTD modificado usando microscopio confocal láser de barrido

Para confirmar la mejora de la funcionalidad del MTD modificado basándose en el MTD convencional de la presente invención, se identificó la permeabilidad celular visible usando un microscopio confocal láser de barrido con respecto a células derivadas de la piel y células derivadas del cáncer.

7-1. Identificación de la permeabilidad celular en células derivadas de la piel

Se usaron queratinocitos humanos inmortalizados (células HaCaT, n.º de catálogo 300493, CLS, Alemania) como células derivadas de la piel, y se usaron péptidos desordenados que no tenían permeabilidad celular, y se usaron Tat y MTS considerados como permeables a las células como controles.

En particular, antes de un ensayo, se cultivaron células HaCaT en una placa de cultivo de 12 pocillos que contenía un cubreobjetos de vidrio durante 24 horas. Se cultivaron células HaCaT en un medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS) y penicilina/estreptomicina al 1 % (10.000 unidades de penicilina y 10.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, invitrogen) en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5 % a 37 °C. Tras tratar con 5 μM de péptidos las células HaCaT durante 1 hora, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4 % a temperatura ambiente durante 20 minutos, observándose la permeabilidad celular usando un microscopio confocal.

Como resultado de ello, como se muestra en las FIG. 7 a 9, se visualizó que la permeabilidad celular del MTD modificado se había mejorado considerablemente mediante la modificación de los péptidos de la presente invención.

7-2. Identificación de la permeabilidad celular en las células de adenocarcinoma cervical

Se comparó la permeabilidad celular de células HeLa (célula HeLa, adenocarcinoma de cuello uterino humano, n.º de catálogo CCL-2, ATCC, EE.UU.) derivadas de adenocarcinoma de cuello uterino humano como células derivadas de cáncer usando un microscopio confocal (Carl Zeisse, Alemania).

En particular, antes de un ensayo, se cultivaron las células HeLa en una placa de cultivo de 12 pocillos con un cubreobjetos de vidrio durante 24 horas. Se cultivaron las células HeLa en un medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS) y penicilina/estreptomicina al 1 % (10.000 unidades de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomicina, invitrogen) en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C. Tras tratar con 5 µM de péptidos las células HaCaT durante 1 hora, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4 % a temperatura ambiente durante 20 minutos, observándose la permeabilidad celular usando un microscopio confocal.

Para detectar directamente el MTD-FITC internalizado, se lavaron las células tres veces con tampón de ácido fosfórico, y se realizó una contratinción con 5 µM de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que es una solución de tinción de fluorescencia del núcleo. Después de 10 minutos de tinción con DAPI, se lavaron las células tres veces con tampón de ácido fosfórico, y para conservar un marcador fluorescente de una proteína, se vertieron 20 µl de medio de montaje en un portaobjetos y se realizó una observación. Se identificaron la transferencia a un núcleo y la permeabilidad celular mediante tinción de las células tratadas con MTD-FITC a través de tinción con DAPI para facilitar la distinción de una parte de transferencia intracelular. Además, se observó una forma original de la célula usando un filtro de nomarski con un microscopio confocal, y se observaron fluorescencia de FITC y fluorescencia de DAPI usando un filtro adecuado para un fluorocromo.

Como resultado de ello, como se muestra en la FIG. 10, se observó que los MTD modificados tienen una capacidad de transducción intracelular considerablemente superior a la del péptido MTD convencional (18m, 67, 103, 159 y 173) usado en el ensayo. Además, a diferencia de los resultados para PTD (Tat), en los que el péptido se unió a un exterior de la membrana celular, se confirmó que los MTD modificados (1018m, 1067, 1103, 1159, 1173A, 2103 y 2159) usados en el ensayo se distribuyeron aparentemente en un citoplasma y, por lo tanto, también se visualizó en células cancerosas una considerable mejora en la permeabilidad celular del MTD modificado recién inventado en la presente invención.

Ejemplo 8. Identificación de la permeabilidad de tejido epitelial *ex vivo* de MTD modificado

Para analizar la permeabilidad del tejido *ex vivo* del MTD modificado de la presente invención, en los modelos epiteliales EpiOral (MatTek, MA, EE.UU.), se trataron selectivamente el MTD conjugado con FITC convencional (18m, 173) y el MTD modificado (1018m y 1173A), y se observaron visualmente por microscopía confocal (Carl Zeisse, Alemania).

En particular, un día antes del ensayo, se cultivaron los modelos epiteliales EpiOral en una placa de 12 pocillos, conteniendo cada pocillo 0,5 ml de un medio de ensayo proporcionado por MatTek en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C durante 15 horas. Al día siguiente, se intercambiaron los medios con medios recién preparados, se trataron con 40 µl de MTD que tenían una concentración de 50 µM sobre la piel de EpiOral y se cultivaron en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C durante 5 horas. Se fijó el modelo epitelial EpiOral en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 horas o más, y se preparó una criosección (6 µm) usando un criosector Microm (criómetro Microm HM520, Thermo) y se colocó un portaobjetos de vidrio para formar un portaobjetos para microscopía. Se trató el portaobjetos formado con tampón de ácido fosfórico durante 10 minutos para lavar un fragmento, y se trató con una solución de DAPI 0,5 mM durante 5 minutos para teñir un núcleo en un tejido. Se volvió a lavar el tejido teñido tres veces durante 10 minutos con tampón de ácido fosfórico, se fijó a un portaobjetos usando medios de montaje y se observó mediante microscopía confocal. Los resultados se muestran en la FIG. 11.

Por consiguiente, como se muestra en la FIG. 11, se confirmó que no se observó ningún nivel significativo de fluorescencia en un control negativo (vehículo), pero el MTD modificado usado en el ensayo atravesó el modelo epitelial EpiOral de acuerdo con el tiempo. Además, en comparación con el MTD convencional (18m, y 173) usado en el ensayo, se confirmó que el material fluorescente se había suministrado de manera más eficaz a un tejido profundo, y el brillo de la fluorescencia también aumentó en el MTD modificado (1018m y 1173A).

Ejemplo 9. Identificación de la permeabilidad del tejido epitelial *in vivo* de MTD modificado

Para analizar la permeabilidad del tejido epitelial *in vivo* del MTD modificado de la presente invención, para ratones ICR hembra de 8 semanas de vida (OrientBio, Corea), se vertieron 100 µl de un MTD modificado unido a indicador fluorescente (M1067)-FITC, Tat-FITC y un solo FITC, cada uno con una concentración de 100 µg sobre una gasa esterilizada que tenía un tamaño de 2,5 cm x 2,5 cm por individuo, y se fijaron en una parte trasera del ratón usando Tegaderm (3M, EE.UU.). Tras 1, 3, 6 y 12 horas, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, y se extrajo la piel de las partes en las que se había aplicado fármaco. Tras ello, se puso la piel en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas para fijar un tejido y luego se preparó en una criosección de 6 µm para formar un portaobjetos. Se trató el portaobjetos formado con tampón PBS durante 10 minutos para lavar el fragmento, y se expuso a una solución de DAPI 0,5 mM durante 5 minutos para teñir un núcleo en el tejido. Se volvió a lavar el tejido teñido tres veces con tampón PBS durante 10 minutos, se fijó con medio de montaje y se observó mediante microscopía confocal. Los resultados se muestran en la FIG. 12.

Por consiguiente, como se muestra en la FIG. 12, se confirmó que no se detectaron señales fluorescentes en el

control negativo, no se indujo permeación epitelial únicamente en el FITC, y los grupos tratados con Tat-FITC, ya que las señales fluorescentes se detectaron específicamente en un estrato córneo, que es la capa superior de la piel. Sin embargo, en el MTD modificado usado en el ensayo, MTD 1067, se confirmó que se produjo la permeación epitelial en un tejido profundo de acuerdo con el tiempo aplicado, y el péptido permeado estaba también específicamente presente en el citoplasma de una célula folicular de la piel. Por lo tanto, se confirmó que el MTD modificado de la presente invención presentó una excelente permeabilidad en el tejido *in vivo*, así como *in vitro*.

Ejemplo 10. Identificación de la permeabilidad celular *in vitro* del complejo peptídico preparado mediante la unión del hexapéptido de acetilo al MTD modificado

Para comparar la permeabilidad celular de acuerdo con la orientación y la combinación de carga del MTD modificado de la presente invención, se sintetizó un complejo peptídico al que se unió un péptido de bajo peso molecular, hexapéptido de acetilo, y se realizó un ensayo para la permeabilidad celular *in vitro* para el complejo peptídico.

En particular, para confirmar la permeabilidad celular, se usaron células de melanoma derivadas de piel humana (A375SM, melanoma humano, KCLB n.º 80004, KCLB, Corea), hexapéptido de acetilo (AH, un péptido compuesto de 6 aminoácidos eficaz en la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento) como péptido de bajo peso molecular, y se usaron un péptido M1067 que tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 16 y un péptido M1103 que tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 17 como MTD modificados.

En particular, un día antes del ensayo, se cultivaron las células A375SM en una placa de cultivo de 12 pocillos con cubreobjetos de vidrio durante 24 horas. Se cultivaron las células A375SM en medio MEM que contenía FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (10.000 unidades de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomicina, Invitrogen) en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % a 37 °C. Se trataron las células A375SM con 5 µM de cada uno de AH no ligado a MTD y MTD-AH ligado a MTD modificado durante 6 horas. Después del tratamiento del péptido, para observar la permeabilidad celular del material de ensayo, se fijaron las células con PFA al 4 % a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Para detectar directamente el MTD-AH internalizado, se lavaron las células tres veces con tampón de ácido fosfórico y se realizó una contratinción con 5 µM de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que es un colorante fluorescente de núcleo. Después de 10 minutos de tinción con DAPI, se lavaron las células tres veces con tampón de ácido fosfórico y se volvió a realizar una contratinción con 5 µg/ml de Con A (Concanavalina A), que es un colorante para una membrana celular. Tras 10 minutos de tinción con Con A, se lavaron las células tres veces con tampón de ácido fosfórico, y para conservar un marcador fluorescente de una proteína, se vertieron 20 µl de medio de montaje en un portaobjetos para observar las células. Se identificaron la transferencia a un núcleo y la permeabilidad celular mediante la tinción de cada célula tratada a través de tinción con DAPI y con Con A para facilitar la distinción de las partes de transferencia intracelular. Además, se observó una forma original de la célula usando un filtro nomarski durante la microscopía confocal, y se observaron la fluorescencia de FITC, la fluorescencia de DAPI y la fluorescencia de Con A usando un filtro adecuado para un fluorocromo.

Por consiguiente, como se muestra en la FIG. 13, se confirmó que M1067F-AH preparado uniendo el MTD modificado, M1067, a hexapéptido de acetilo en sentido directo, y M1067R-AH preparado uniendo el MTD modificado a un extremo C-terminal de hexapéptido de acetilo en sentido inverso, M1103F-AH preparado uniendo un aminoácido del MTD modificado, M1103, a hexapéptido de acetilo en sentido directo y M1103R-AH unido a un extremo C-terminal del hexapéptido de acetilo en sentido inverso resultaron tener una excelente permeabilidad celular, en comparación con el control de hexapéptido de acetilo al que no se unió MTD.

Por consiguiente, se observó que el MTD modificado inventado para la presente invención estaba unido a una molécula biológicamente activa, presentando así una excelente permeabilidad celular al unir la secuencia de aminoácidos del MTD modificado en sentido directo, o al unirlo mientras estaba dispuesto en sentido inverso, y por lo tanto, la presente invención no está limitada por el sentido de la unión de la misma.

Ejemplo 11. Identificación de la permeabilidad del tejido de pulmón *in vivo* de MTD modificado

11-1. Preparación de MTD conjugado con ARNip

Para analizar la permeabilidad del tejido pulmonar *in vivo* del MTD modificado de la presente invención, se preparó principalmente MTD conjugado con ARNip. En este caso, se realizó un enlace covalente entre un péptido y ARNip usando 4FB-ARNip y HyNic-péptido de acuerdo con un método de conjugación de oligonucleótido/péptido de solulink.

En particular, se disolvió primero N-succinimidil-4-formilbenzamida (S-4FB) en una solución de DMF, se introdujo S-4FB en tampón de conjugación (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6,0) en una cantidad 20 veces las concentraciones de ARNip de LacZ y ARNip de LacZ, y se realizó una reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Para intercambiar el exceso de S-4FB presente en la mezcla de reacción con un tampón, se realizó la purificación por desalación.

En segundo lugar, se disolvieron succinimidil-6-hidrazino-nicotinamida (6-Boc-Hynic) y O-benzotriazol-1-il-tetrametiluronio (HBTU) en DMF, se añadió diisopropiletilamina (DiPEA), y se añadió el producto resultante inmediatamente a una resina de péptido protegida con Fmoc. Después de una reacción de 1 hora, para el aislamiento desde una resina de péptido hínico, se usó TFA/TIS/acetona/H₂O (92,5/2,5/2,5/2,5). El producto resultante se purificó por HPLC, y se preparó un péptido hínico a través de identificación por EM.

En tercer lugar, se mezclaron el ARNip de LacZ modificado con 4FB y el péptido hínico correspondiente a 5 veces la proporción molar del ARNip de LacZ modificado con 4FB en tampón catalizador TurboLink (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 15 mM, anilina 10 mM, pH 6,0) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

Finalmente, se retiraron los péptidos en exceso del producto de reacción usando diafiltración de Sartorius Vivaspin y se identificaron con un gel de agarosa NuSieve GTG al 2 %. Se identificó un peso molecular del péptido usando un espectrómetro de masas, y se liofilizó el péptido para preparar un conjugado covalente de ARNip-péptido.

11-2. Identificación de la permeabilidad del tejido pulmonar *in vivo* de MTD modificado

Para analizar la permeabilidad tisular *in vivo* del MTD modificado de la presente invención, se administraron por vía intravenosa 200 µg/cabeza de LacZ-ARNip-Cy3 fusionado al MTD 2173A modificado preparado mediante el método del Ejemplo 10-1 en ratones B6 ROSA26 que expresaron de manera continua una β-galactosidasa durante 3 días y, tras dos días, se sacrificaron los ratones para extraer los pulmones. Se pusieron los pulmones extraídos en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 horas o más para su fijación, se preparó una criosección usando un micrótopo de congelación Microm (criómetro Microm HM520, Thermo) y se colocó un portaobjetos de vidrio para fabricar un portaobjetos para microscopía. Se trató el portaobjetos fabricado con tampón de ácido fosfórico durante 10 minutos para lavar un fragmento, y se trató con una solución de DAPI 0,5 mM durante 5 minutos para teñir un núcleo en un tejido. Se volvió a lavar el tejido teñido de nuevo con tampón de ácido fosfórico tres veces durante 10 minutos, se fijó usando medio de montaje y se observó mediante microscopía confocal. Los resultados se muestran en la FIG. 15. Tras ello, se hizo reaccionar el portaobjetos fabricado como se ha descrito anteriormente en un colorante X-gal durante la noche, y después se tiñó un tejido con tinción de hematoxilina-eosina (HE) para observar la actividad de una β-galactosidasa. Los resultados se muestran en la FIG. 16.

Por consiguiente, como se muestra en la FIG. 15, no se observó un nivel significativo de fluorescencia en el control negativo (vehículo), pero se produjo la permeación intracelular de un tejido pulmonar en el ARNip-Cy3 de MTD-LacZ usado en el ensayo.

Además, como se muestra en la FIG. 16, se observó la actividad β-galactosidasa en la mayoría de los fragmentos de órganos del control negativo, pero rara vez se observó en un fragmento de órgano de ratones inyectados con ARNip-Cy3 de MTD-LacZ.

Por consiguiente, se puede observar que se puede usar el MTD modificado de la presente invención en el suministro de un material tal como ARNip o un fármaco, que es difícil de suministrar a las células, y puede suministrar de manera eficaz el material o fármaco a un tejido de órgano, y el material o fármaco suministrado puede ser eficaz en el tejido.

Por lo tanto, se vio que el MTD modificado de la presente invención también se mejoró en cuanto a la permeabilidad *en vivo* en un tejido, así como en la permeabilidad intracelular, en comparación con el MTD convencional.

Ejemplo 12. Evaluación de la seguridad cutánea del MTD modificado al que se acopló una sustancia activa dermatológica

12-1. Síntesis de MTD modificado-ácido cumárico

Se trató una solución de piperidina al 20 %/N-metilpirrolidona con el MTD modificado (M1067) sintetizado en el Ejemplo 4, en el que se acopló el aminoácido del extremo N-terminal, para eliminar un grupo Fmoc, se lavó con N-metilpirrolidona y diclorometano, y se acopló un compuesto disponible en el mercado, ácido cumárico (Sigma, EE.UU.). Tras el acoplamiento, se lavó el producto resultante varias veces con N-metilpirrolidona y diclorometano, y se secó bajo nitrógeno gaseoso. En este caso, se trató el producto seco durante 2 a 3 horas con una solución que contenía ácido trifluoroacético:fenol:tioanisol:agua:triisopropilsilano en una proporción de 90:2,5:2,5:2,5:2,5 (v/v) para eliminar un grupo protector peptídico, se aisló el ácido cumárico unido a péptido de una resina, y se hizo precipitar el péptido con éter dietílico. Se añadió Pd/C al 10 % a metanol para eliminar un grupo bencilo que protegía un grupo alcohol mediante la unión al 9º átomo de carbono de C del ácido cumárico, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora bajo hidrógeno, y se descomprimió y se concentró una solución restante obtenida mediante la eliminación del Pd/C usando celite. Se purificó el derivado de MTD modificado-ácido cumárico obtenido como se ha descrito anteriormente usando la columna de cromatografía líquida de alto rendimiento purificada de fase inversa (Zobax, C8 300 Å, 21,1 mm x 25 cm) con un gradiente de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %, sintetizando de este modo un derivado de MTD modificado-ácido cumárico en el que el ácido cumárico se había acoplado a un MTD modificado que tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 16 representada

por la Fórmula 2.

[Formula 2]

(4-Hidroxicinamoil) Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Ala Arg Met

5 12-2. Síntesis de MTD modificado-pentapéptido de acetilo

Se sintetizaron secuencialmente pentapéptidos de acetilo (Lys Ther Ther Lys Ser acetilados), que son péptidos disponibles en el mercado de la industria cosmética, en el MTD modificado (M1067) que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 16 sintetizada en el Ejemplo 4, en la que se acopló el aminoácido en el extremo N-terminal, se trató con una solución de piperidina al 20 %/N-metilpirrolidona para eliminar un grupo Fmoc, se lavó varias veces con N-metilpirrolidona y diclorometano, y se secó bajo nitrógeno gaseoso. En este caso, se trató el producto seco durante 2 a 3 horas con una solución que contenía ácido trifluoroacético:fenol:tioanisol:agua:triisopropilsilano en una proporción de 90:2,5:2,5:2,5:2,5 (v/v) para eliminar un grupo protector peptídico, y se aisló el péptido de una resina, y después se hizo precipitar con éter dietílico. Se purificó el derivado de MTD modificado- pentapéptido de acetilo obtenido como se ha descrito anteriormente usando una columna de cromatografía líquida de alto rendimiento purificada de fase inversa (Zobax, C8 300 Å, 21,1 mm x 25 cm) con un gradiente de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %, sintetizando de este modo un MTD modificado (M1067) que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO: 16, que estaba representado por la Fórmula 3.

[Fórmula 3]

Met Arg Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala Lys* Ther Ther

20 Lys Ser

*: lisina acetilada.

12-3. Preparación de la composición para cosmética que contiene MTD modificado (M1067) - ácido cumárico

25 Se formuló una composición de esencia que contenía MTD modificado (M1067) - ácido cumárico o MTD modificado (M1067) en una composición mostrada en la siguiente Tabla 1.

30 Se añadieron los componentes 1 a 6 a un disolvente de agua, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se transfirieron a un tanque de emulsionante. Se añadieron los componentes 7 a 11 a un disolvente de aceite, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se mezclaron en el tanque de emulsionante. Se enfrió el contenido hasta 40 °C, y se añadieron los componentes 12, 13 y 15 al tanque de emulsionante, y se enfrió hasta la temperatura ambiente, preparando de este modo una composición que contenía MTD modificado (M1067)-ácido cumárico.

35 Ejemplo comparativo 1: se añadieron los componentes 1 a 6 a un disolvente de agua, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se transfirieron a un tanque de emulsionante. Se añadieron los componentes 7 a 11 a un disolvente de aceite, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se mezclaron en el tanque de emulsionante. Se enfrió el contenido hasta 40 °C, y se añadieron los componentes 12 a 14 al tanque de emulsionante, y se enfrió hasta la temperatura ambiente, preparando de este modo una composición que contenía MTD modificado (M1067).

45 Ejemplo comparativo 2: se añadieron los componentes 1 a 6 a un disolvente de agua, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se transfirieron a un tanque de emulsionante. Se añadieron los componentes 7 a 11 y 16 a un disolvente de aceite, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se mezclaron en el tanque de emulsionante. Se enfrió el contenido hasta 40 °C, y se añadieron los componentes 12 y 13 al tanque de emulsionante, y se enfrió hasta la temperatura ambiente, preparando de este modo una composición que contenía ácido cumárico.

[Tabla 1]

50 Composición de la composición de esencia que contiene un MTD modificado (M1067)-ácido cumárico (unidad: % en peso).

n.º	Componente	Ejemplo 12-1	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2
1	Agua destilada	84,480	84,480	64,480
2	Alcohol	0,000	0,000	20,000

n.º	Componente	Ejemplo 12-1	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2
3	Glicerina	5,000	5,000	5,000
4	Dipropilenglicol	3,000	3,000	3,000
5	Alantoína	0,100	0,100	0,100
6	EDTA disódico	0,020	0,020	0,020
7	Aceite de oliva	2,000	2,000	2,000
8	Triglicérido caprílico/cáprico	2,000	2,000	2,000
9	Copolímero de acrilato sódico/acrilodimetiltaurato sódico	0,667	0,667	0,667
10	Isohexadecano	0,667	0,667	0,667
11	Polisorbato 80	0,667	0,667	0,667
12	Clorofenesina	0,250	0,250	0,250
13	Metilparabeno	0,150	0,150	0,150
14	Péptido de transducción molecular intracelular	0,000	1,000	0,000
15	Péptido de transducción molecular intracelular- ácido cumárico	1,000	0,000	0,000
16	Ácido cumárico	0,000	0,000	1,000

12-4. Preparación de una composición cosmética que contiene MTD modificado (M1067)- pentapéptido de acetilo

5 Se formuló una composición de esencia que contenía MTD modificado (M1067)-pentapéptido de acetilo o MTD modificado (M1067) en la composición mostrada en la siguiente Tabla 2.

10 Se añadieron los componentes 1 a 5 a un disolvente de agua, se calentaron hasta 70 °C para disolverse por completo y se transfirieron a un tanque de emulsionante. Se añadieron los componentes 6 a 10 a un disolvente de aceite, se calentaron hasta 70 °C para disolverse por completo y se mezclaron en el tanque de emulsionante. Se enfrió el contenido hasta 40 °C, y se añadieron los componentes 11, 12 y 14 al tanque de emulsionante, y se enfriaron hasta la temperatura ambiente, preparando de este modo una composición que contenía MTD modificado (M1067)-pentapéptido de acetilo.

15 Ejemplo comparativo 3. Se añadieron los componentes 1 a 5 a un disolvente de agua, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se transfirieron a un tanque de emulsionante. Se añadieron los componentes 6 a 10 a un disolvente de aceite, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se mezclaron en el tanque de emulsionante. Se enfrió el contenido hasta 40 °C, y se añadieron los componentes 11 a 13 al tanque de emulsionante, y se enfrió hasta la temperatura ambiente, preparando de este modo una composición que contenía MTD modificado (M1067).

20 Ejemplo comparativo 4: se añadieron los componentes 1 a 5 a un disolvente de agua, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se transfirieron a un tanque de emulsionante. Se añadieron los componentes 7 a 11 y 16 a un disolvente de aceite, se calentaron hasta 70 °C para disolverlos completamente y se mezclaron en el tanque de emulsionante. Se enfrió el contenido hasta 40 °C, y se añadieron los componentes 11, 12 y 15 al tanque de emulsionante, y se enfrió hasta la temperatura ambiente, preparando de este modo una composición que contenía ácido cumárico.

25

[Tabla 2]

Composición de esencia que contiene un MTD modificado (M1067)-pentapéptido de acetilo (unidad: % en peso).				
n.º	Componente	Ejemplo 12-2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
1	Agua destilada	Hasta 100	Hasta 100	Hasta 100
2	Glicerina	5,000	5,000	5,000
3	Dipropilenglicol	3,000	3,000	3,000
4	Alantoína	0,100	0,100	0,100
5	EDTA disódico	0,020	0,020	0,020
6	Aceite de oliva	2,000	2,000	2,000
7	Triglicérido caprílico/cáprico	2,000	2,000	2,000
8	Copolímero de acrilato sódico/acrilodimetilaurato sódico	0,667	0,667	0,667
9	Isohexadecano	0,667	0,667	0,667
10	Polisorbato 80	0,667	0,667	0,667
11	Clorofenesina	0,250	0,250	0,250
12	Metilparabeno	0,150	0,150	0,150
13	Péptido de transducción molecular intracelular	0,000	0,100	0,000
14	Péptido de transducción molecular intracelular- pentapéptido de acetilo	0,100	0,000	0,000
15	Pentapéptido de acetilo	0,000	0,000	0,100

12-5. Evaluación de la seguridad cutánea del complejo de MTD modificado y de una sustancia activa dermatológica

5 Para confirmar la seguridad del MTD modificado (M1067) sintetizado en el Ejemplo 4, el MTD modificado (M1067)-ácido cumárico y el MTD modificado (M1067)-pentapéptido de acetilo sintetizado en los Ejemplos 12-1 y 12-2, se realizó un ensayo de estímulo primario usando piel humana. El ensayo fue realizado por una organización de investigación clínica especializada, Dermapro, y la composición clínica se preparó como se describirá a continuación. Se seleccionaron 30 o más sujetos que cumplieran con las normas para el ensayo clínico y que no estaban incluidos en las normas de exclusión. Se aplicaron materiales de muestra en la espalda de los sujetos, y se retiraron tras 48 horas. Se observaron los sitios de ensayo durante 30 minutos, y 24 horas más tarde, tras la eliminación.

15 La evaluación de la piel se realizó mediante el método de Frosch y Kligman (Frosch P. J. y Kligman A. M. J. Am. Acad. Dermatol, 1(1): 35-41 (1979)) y las normas mostradas en la Tabla 3 que refleja las directrices de la Asociación de Cosméticos, Productos de Tocador y Perfumería (CTFA) (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D.C. 20005 (1981)), se compararon los grados medios de reacción tras 48 y 72 horas, y los resultados se determinaron basándose en el grado medio de reacción de cada composición.

20

[Tabla 3]

Registro de las reacciones del ensayo con parche		
Símbolo	Grado	Descripción clínica
+	1	Ligero eritema, bien desigual o difuso
++	2	Eritema uniforme moderado
+++	3	Eritema intenso con edema
++++	4	Eritema intenso con edema y vesículas

[Tabla 4]

Resultados del ensayo de estímulo primario para la piel humana (n = 30)											
N.º	Nombre del material de ensayo	N.º de respondedor	48 h			72 h			Grado de reacción		
			1+	2+	3+	1+	2+	3+	47 h	72 h	Media
1	Que contiene MTD modificado al 0,1 % (M1067)	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0
2	Que contiene MTD modificado al 1 % (M1067)	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0
3	Que contiene MTD modificado al 1 % (M1067)-ácido cumárico	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0
4	Que contiene ácido cumárico al 1 %	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0
5	Que contiene MTD modificado al 0,1 % (M1067)-pentapéptido de acetilo	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0
6	Que contiene pentapéptido de acetilo al 0,1 %	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0
7	Control (Escualano)	0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0

5 Como se muestra en la Tabla 4, se evaluaron el MTD modificado (M1067), el MTD modificado (M1067)-ácido cumárico y el MTD modificado (M1067)-pentapéptido de acetilo como materiales de estímulos bajos en el ensayo de estímulo primario de piel humana. Por consiguiente, se demostró que el MTD modificado (M1067) se puede usar de forma segura en seres humanos a través del ensayo clínico realizado por la organización de investigación especializada.

10 Además, se puede observar que el MTD modificado de la presente invención también se mejoró en cuanto a la permeabilidad intracelular y la permeabilidad *in vivo* en un tejido más que el MTD convencional a través de los ejemplos descritos anteriormente. Además, también se demostró que el MTD modificado era seguro para los seres humanos y, por lo tanto, que se puede usar de manera eficaz en diversas investigaciones, y el tratamiento de un paciente de una enfermedad específica que requiere la administración eficaz del fármaco, dando lugar a una alta utilidad en el desarrollo de fármacos nuevos y modificados.

15 Aunque la invención se ha mostrado y descrito con referencia a ciertas realizaciones ilustrativas de la misma, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y en los detalles sin apartarse del alcance de la invención según lo definido por las reivindicaciones adjuntas.

20 [Texto previo de Listado de Secuencias]

<110> PROCELL THERAPEUTICS INC.

25 <120> Desarrollo del dominio de transducción macromolecular con permeabilidad celular mejorada y sus aplicaciones

<130> PCT01613

30 <150> US 61/563.110

<151> 23-11-2011

<160> 56

35 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 14

ES 2 621 337 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-018

<400> 1

Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val

1 5 10

10 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-067

20 <400> 2

Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala

1 5

25 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-103

<400> 3

Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala

1 5

35 <210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-159

<400> 4

Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu

1 5 10

45 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial

ES 2 621 337 T3

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-173

5 <400> 5

Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro

1 5

10 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 18m

<400> 6

Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val

1 5 10

20 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 173A

<400> 7

Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val

30 1 5

35 <210> 8
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-018

40 <400> 8
gcggcgctga ttggcgcggt gctggcgccg gtggggcgg tg 42

45 <210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-067

<400> 9
gcggcggcgc cggcggggc gccg 24

55 <210> 10
<211> 27

ES 2 621 337 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-103	
	<400> 10	
	ctggcgctgc cggctgctgct gctggcg	27
10	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-159	
	<400> 11	
20	aatgcgaatg cggcgaatcc ggcgaatctg gcgctg	36
	<210> 12	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-173	
	<400> 12	
30	gcggtgaatc cgaatctggc ggtgccg	27
	<210> 13	
	<211> 42	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-018m	
	<400> 13	
40	ccggcggcgc tggcggcgcct gccggtggcg gtggtggcgg tg	42
	<210> 14	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-173A	
50	<400> 14	
	ccggcggatga atccgaatct ggcggtg	27
	<210> 15	
	<211> 16	
55	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1018	
	<400> 15	

ES 2 621 337 T3

Met Arg Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val

1 5 10 15

5 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1067
<400> 16

Mct Arg Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala

1 5 10

15 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1103
<400> 17

Met Arg Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala

25 1 5 10

30 <210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1159
<400> 18

Mct Arg Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu

1 5 10

40 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1173
<400> 19

Met Arg Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro

1 5 10

5 <210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1018m
<400> 20

Met Arg Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val

1 5 10 15

15 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1173A
<400> 21

Met Arg Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val

1 5 10

25 <210> 22
<211> 16
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2018
35 <400> 22

Met His Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val

1 5 10 15

40 <210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2067
<400> 23

Met His Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala

1 5 10

5 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2103
<400> 24

Met His Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala

1 5 10

15 <210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2159
<400> 25

Met His Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu

25 1 5 10

30 <210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2173
<400> 26

Met His Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro

1 5 10

40 <210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2018m
<400> 27

Met His Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val

1 5 10 15

5 <210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2173A
<400> 28

Met His Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val

1 5 10

15 <210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3018
<400> 29

Met Lys Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val

25 1 5 10 15

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

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3067
<400> 30

Met Lys Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala

1 5 10

40 <210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3103
<400> 31

Met Lys Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala

1 5 10

5 <210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3159
<400> 32

Met Lys Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu

1 5 10

15 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3173
<400> 33

Met Lys Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro

1 5 10

25 <210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3018m

35 <400> 34

Met Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val

1 5 10 15

40 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3173A
<400> 35

Met Lys Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val

	1	5	10
	<210> 36		
5	<211> 48 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1018		
	<400> 36 atgagggcgg cgctgattgg cgcggtgctg gcgccggtgg tggcggtg 48		
15	<210> 37 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
	<220>		
20	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1067		
	<400> 37 atgagggcgg cggcgccggc ggtggcggcg 30		
25	<210> 38 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
	<220>		
30	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1103		
	<400> 38 atgaggctgg cgctgccggt gctgctgctg gcg 33		
35	<210> 39 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1159		
	<400> 39 atgaggattg cgattgcggc gattccggcg attctggcgc tg 42		
45	<210> 40 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
	<220>		
50	<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1173		
	<400> 40 atgagggcgg tgattccgat tctggcggtg ccg 33		
55	<210> 41 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
60			

ES 2 621 337 T3

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1018m

5 <400> 41
 atgaggccgg cggcgctggc ggcgctgccg gtggcgggtg tggcggtg 48

<210> 42
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1173A

15 <400> 42
 atgaggccgg cggtgattcc gattctggcg gtg 33

<210> 43
 <211> 48
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2018

25 <400> 43
 atgcacgcbg cgctgattgg cgcggtgctg gcgccggtgg tggcggtg 48

<210> 44
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2067

35 <400> 44
 atgcacgcbg cggcgccggc ggtggcggcg 30

<210> 45
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2103

<400> 45
 50 atgcacctgg cgctgccggt gctgctgctg gcg 33

<210> 46
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2159

<400> 46
 60 atgcacattg cgattgcggc gattccggcg attctggcgc tg 42

<210> 47
 <211> 33
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 621 337 T3

<220>
<223> Secuencia polinucleotidica de MTD 3159

5 <400> 53
atgaagattg cgattgcggc gattccggcg attctggcgc tg 42
<210> 54

10 <211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia polinucleotidica de MTD 3173

<400> 54
atgaagccgg tgattccgat tctggcggcg ccg 33

20 <210> 55
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Secuencia polinucleotidica de MTD 3018m

<400> 55
atgaagccgg cggcgctggc ggcgctgccg gtggcgggtg tggcggcg 48

30 <210> 56
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia polinucleotidica de MTD 3173A

40 <400> 56
atgaagccgg cggtgattcc gattctggcg gtg 33

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PROCELL THERAPEUTICS INC.

5 <120> Desarrollo del dominio de transducción de macromoléculas con permeabilidad celular mejorada y sus aplicaciones

<130> PCT01613

10 <150> US 61/563.110
<151> 23-11-2011

<160> 56

15 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-018

25 <400> 1

Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val
1 5 10

<210> 2

30 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-067

<400> 2

Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala
1 5

40 <210> 3
<211> 9

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-103

<400> 3

50

Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala
1 5

<210> 4

55 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-159

ES 2 621 337 T3

<400> 4

Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu
1 5 10

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

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD JO-173
<400> 5

Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro
1 5

15 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 18m

25 <400> 6

Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val
1 5 10

30 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 173A
<400> 7

Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val
1 5

40 <210> 8
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-018

50 <400> 8
gcggcgctga ttggcgcggt gctggcgccg gtggggcgg tg 42

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-067

ES 2 621 337 T3

	<400> 9 gcggcggcgc cggcgggtggc ggcg	24
5	<210> 10 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-103	
	<400> 10 ctggcgcctgc cggctgctct gctggcg	27
15	<210> 11 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-159	
25	<400> 11 aatgcgaatg cggcgaatcc ggccaatctg gcgctg	36
30	<210> 12 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-173	
35	<400> 12 gcggtgaatc cgaatctggc ggtgccg	27
40	<210> 13 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-018m	
45	<400> 13 ccggcggcgc tggcggcgt gccggtggcg gtggtggcgg tg	42
50	<210> 14 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Secuencia polinucleotídica de MTD JO-173A	
55	<400> 14 ccggcgggtga atccgaatct ggcggtg	27
60	<210> 15 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1018	

ES 2 621 337 T3

<400> 15

Met Arg Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val
1 5 10 15

5 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1067

<400> 16

Met Arg Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala
1 5 10

15 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1103

25 <400> 17

Met Arg Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala
1 5 10

30 <210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1159

<400> 18

Met Arg Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu
1 5 10

40 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1173

<400> 19

50 Met Arg Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro
1 5 10

<210> 20
55 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 621 337 T3

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1018m

<400> 20

5

Met Arg Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val
1 5 10 15

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 1173A

15

<400> 21

Met Arg Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val
1 5 10

20

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2018

<400> 22

Met His Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val
1 5 10 15

30

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2067

40

<400> 23

Met His Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala
1 5 10

45

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2103

<400> 24

Met His Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala
1 5 10

55

<210> 25
<211> 14

ES 2 621 337 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2159

<400> 25

Met His Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu
1 5 10

10 <210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2173

20 <400> 26

Met His Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro
1 5 10

25 <210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2018m

<400> 27

Met His Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val
1 5 10 15

35 <210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 2173A

<400> 28

Met His Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val
1 5 10

45 <210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3018

55 <400> 29

Met Lys Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val
1 5 10 15

ES 2 621 337 T3

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3067

10 <400> 30

Met Lys Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala
1 5 10

<210> 31
15 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3103

<400> 31

Met Lys Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala
1 5 10

25 <210> 32
<211> 14
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3159

<400> 32

35 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3173

<400> 33

Met Lys Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro
1 5 10

50 <210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3018m

<400> 34

ES 2 621 337 T3

Met Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val
1 5 10 15

5 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de MTD 3173A

<400> 35

Met Lys Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val
1 5 10

15 <210> 36
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1018

25 <400> 36
 atgagggcgg cgctgattgg cgcggtgctg gcgccggtgg tggcgggtg 48

30 <210> 37
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1067

35 <400> 37
 atgagggcgg cggcgccggc ggtggcggcg 30

40 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1103

45 <400> 38
 atgaggctgg cgctgccggt gctgctgctg gcg 33

50 <210> 39
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1159

55 <400> 39
 atgaggattg cgattgcggc gattccggcg attctggcgc tg 42

60 <210> 40
 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 621 337 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1173
 5
 <400> 40
 atgagggcgg tgattccgat tctggcgggtg ccg 33
 <210> 41
 10 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1018m
 <400> 41
 atgaggccgg cggcgctggc ggcgctgccg gtggcgggtg tggcgggtg 48
 20 <210> 42
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 1173A
 <400> 42
 30 atgaggccgg cggtgattcc gattctggcg gtg 33
 <210> 43
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2018
 <400> 43
 40 atgcacgcgg cgctgattgg cgcggtgctg gcgccggtgg tggcgggtg 48
 <210> 44
 <211> 30
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2067
 50 <400> 44
 atgcacgcgg cggcgccggc ggtggcggcg 30
 <210> 45
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2103
 60 <400> 45
 atgcacctgg cgctgcccgt gctgctgctg gcg 33
 <210> 46
 65 <211> 42
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2159
 5
 <400> 46
 atgcacattg cgattgcggc gattccggcg attctggcgc tg 42
 <210> 47
 10 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2173
 <400> 47
 atgcacgcgg tgattccgat tctggcggg ccg 33
 20 <210> 48
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2018m
 <400> 48
 30 atgcaccg cggcgctggc ggcgctgccg gtggcggg tgccggg 48
 <210> 49
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 2173A
 <400> 49
 40 atgcaccg cggtgattcc gattctggcg gtc 33
 <210> 50
 <211> 48
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3018
 50 <400> 50
 atgaaggcgg cgctgattgg cgcgggctg gcgccggg tgccggg 48
 <210> 51
 <211> 30
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3067
 60 <400> 51
 atgaaggcgg cggcgcggc ggtggcggc 30
 <210> 52
 65 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 621 337 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3103

5

<400> 52
atgaagctgg cgctgccggt gctgctgctg gcg 33

<210> 53
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3159

15

<400> 53
atgaagattg cgattgcggc gattccggcg attctggcgc tg 42

20

<210> 54
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3173

30

<400> 54
atgaagcggg tgattccgat tctggcggtg ccg 33

35

<210> 55
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3018m

<400> 55
atgaagccgg cggcgctggc ggcgctgccg gtggcgggtg tggcggtg 48

45

<210> 56
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia polinucleotídica de MTD 3173A

50

<400> 56
atgaagccgg cgggtattcc gattctggcg gtg 33

REIVINDICACIONES

1. Un péptido representado por la Fórmula 1:

5 [Fórmula 1]
A1-A2-MTD

10 en la que A1 es metionina (M, Met); A2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina (R, Arg), histidina (H, His) y lisina (K, Lys), y un MTD tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1 a 7.

15 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho péptido es capaz de mediar en el transporte de una molécula biológicamente activa al interior de una célula, y tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 15 a 35.

3. Un polinucleótido que codifica el péptido de la reivindicación 1 o 2.

20 4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene una secuencia de bases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36 a 56.

5. Un vector de expresión de proteínas que comprende un polinucleótido de la reivindicación 3 o 4.

6. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 5.

25 7. Un método de obtención por ingeniería genética de una molécula biológicamente activa que tiene permeabilidad celular, que comprende:

30 unir un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15 a 35 a la molécula biológicamente activa.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la molécula biológicamente activa está unida a un extremo N-terminal, a un extremo C-terminal o a ambos extremos del péptido, o en el que el péptido está unido a un extremo C-terminal de la molécula biológicamente activa en un sentido inverso.

35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la unión se realiza mediante un enlace peptídico o un enlace químico.

40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el enlace químico se selecciona del grupo que consiste en enlaces disulfuro, enlaces diamina, enlaces sulfuro-amina, enlaces carboxilamina, enlaces éster y enlaces covalentes.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la molécula biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en:

- 45 i) proteínas, polipéptidos y péptidos;
ii) factores de crecimiento, enzimas, factores de transcripción, toxinas, péptidos antigénicos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo;
iii) enzimas, hormonas, vehículos proteicos, inmunoglobulinas, anticuerpos, proteínas estructurales, proteínas de función motora, receptores, proteínas de señalización, proteínas de almacenamiento, proteínas de membrana, proteínas transmembrana, proteínas internas, proteínas externas, proteínas secretoras, proteínas víricas, proteínas nativas, glicoproteínas, proteínas escindidas, proteínas que tienen un enlace disulfuro, complejos de proteínas, proteínas modificadas químicamente y priones; o
50 iv) ácidos nucleicos, secuencias de ácido nucleico codificantes, ARNm, moléculas de ARN antisentido (microARN o ARNip), hidratos de carbono, lípidos y glicolípidos.

55 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la molécula biológicamente activa es un fármaco terapéutico o un compuesto tóxico.

60 13. Un método *in vitro* de transporte de una molécula biológicamente activa al interior de una célula que comprende:

administrar a una célula un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15 a 35, al que está unida una molécula biológicamente activa.

14. Uso de un péptido de la reivindicación 1 o 2 en un sistema de suministro de fármacos, una vacuna de proteína recombinante o en la producción de una composición farmacéutica.

5

15. Un péptido de la reivindicación 1 o 2 unido a una molécula biológicamente activa para su uso en terapia de proteínas.

FIG. 1

SEQ ID		SECUENCIA	ESTRUCTURA
NO: 15	MTD 1018	Met Arg Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val	
NO: 22	MTD 2018	Met His Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val	
NO: 29	MTD 3018	Met Lys Ala Ala Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Val Val Ala Val	
NO: 16	MTD 1067	Met Arg Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala	
NO: 23	MTD 2067	Met His Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala	
NO: 30	MTD 3067	Met Lys Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala	
NO: 17	MTD 1103	Met Arg Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala	

FIG. 2

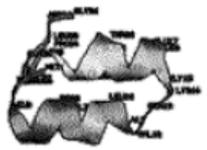
SEQ ID		SECUENCIA	ESTRUCTURA
NO: 24	MTD 2103	Met His Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala	
NO: 31	MTD 3103	Met Lys Leu Ala Leu Pro Val Leu Leu Leu Ala	
NO: 18	MTD 1159	Met Arg Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu	
NO: 25	MTD 2159	Met His Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu	
NO: 32	MTD 3159	Met Lys Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu	
NO: 19	MTD 1173	Met Arg Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro	
NO: 26	MTD 2173	Met His Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro	

FIG. 3

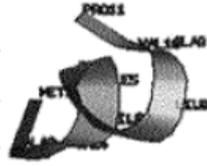
SEQ ID		SECUENCIA	ESTRUCTURA
NO: 33	MTD 3173	Met Lys Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val Pro	
NO: 6	MTD 18m	Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val	
NO: 20	MTD 1018m	Met Arg Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val	
NO: 27	MTD 2018m	Met His Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val	
NO: 34	MTD 3018m	Met Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val	
NO: 7	MTD 173A	Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val	
NO: 21	MTD 1173A	Met Arg Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val	

FIG. 4

SEQ ID		SECUENCIA	ESTRUCTURA
NO: 28	MTD 2173A	Met His Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val	
NO: 35	MTD 3173A	Met Lys Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val	

FIG. 5

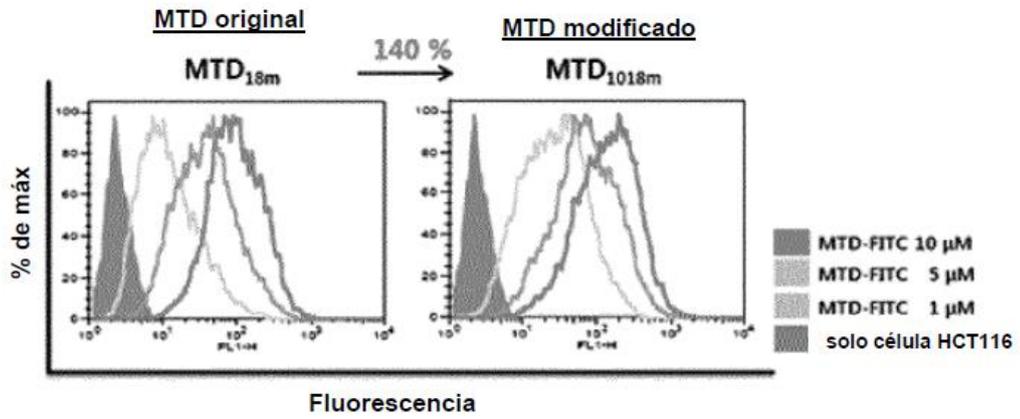
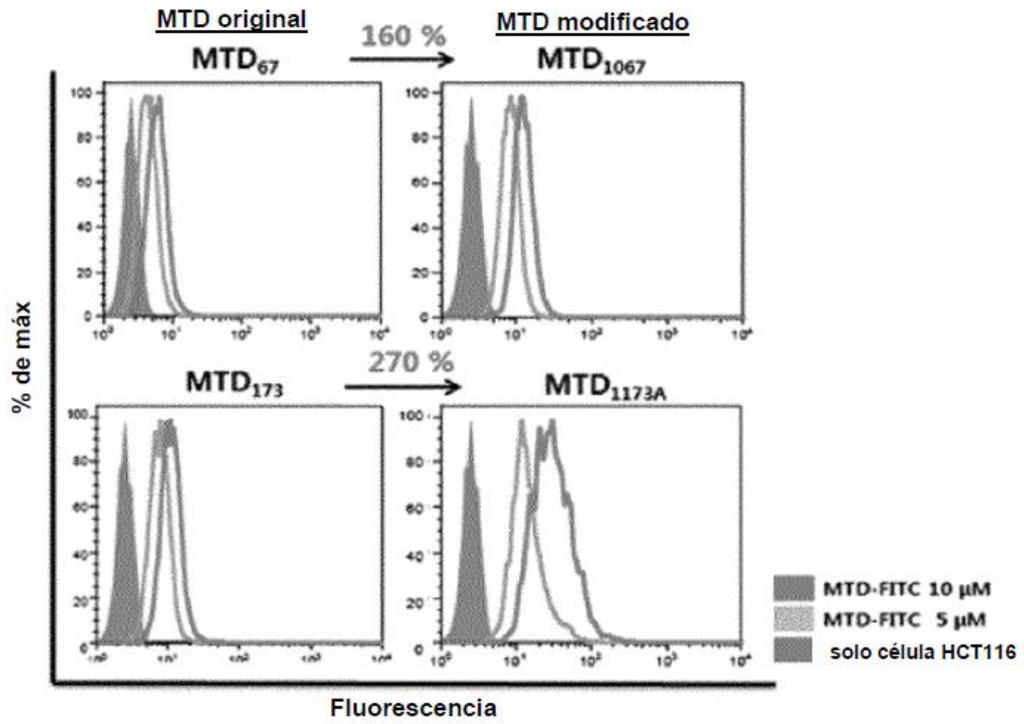


FIG. 6

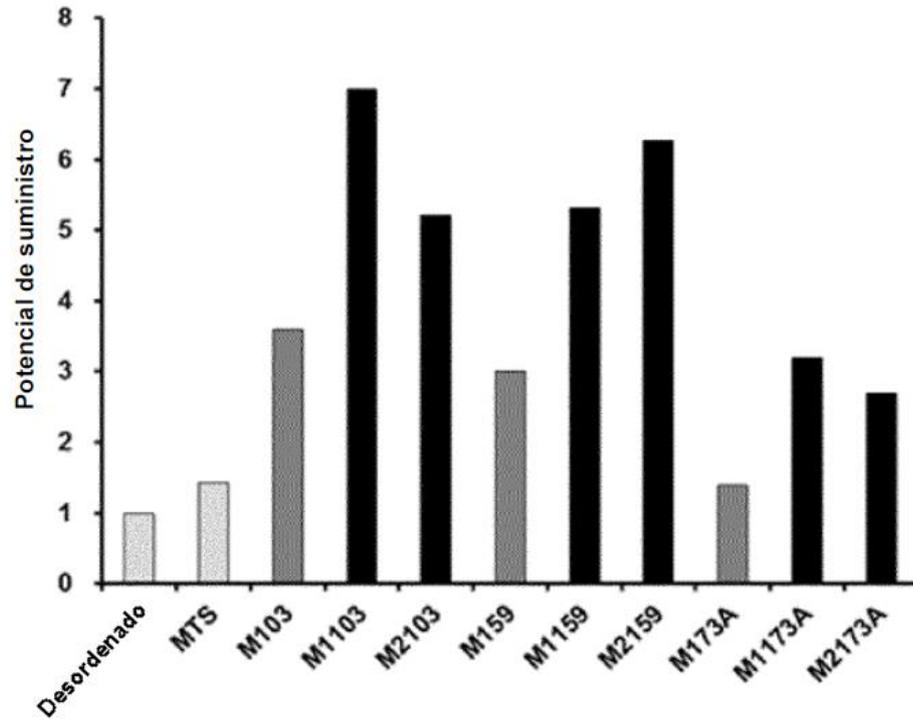
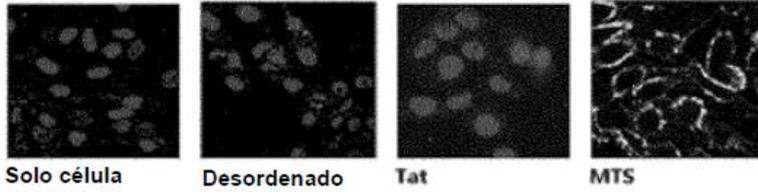


FIG. 7

CONTROL



Aumento x 630

GRUPOS DE ENSAYO

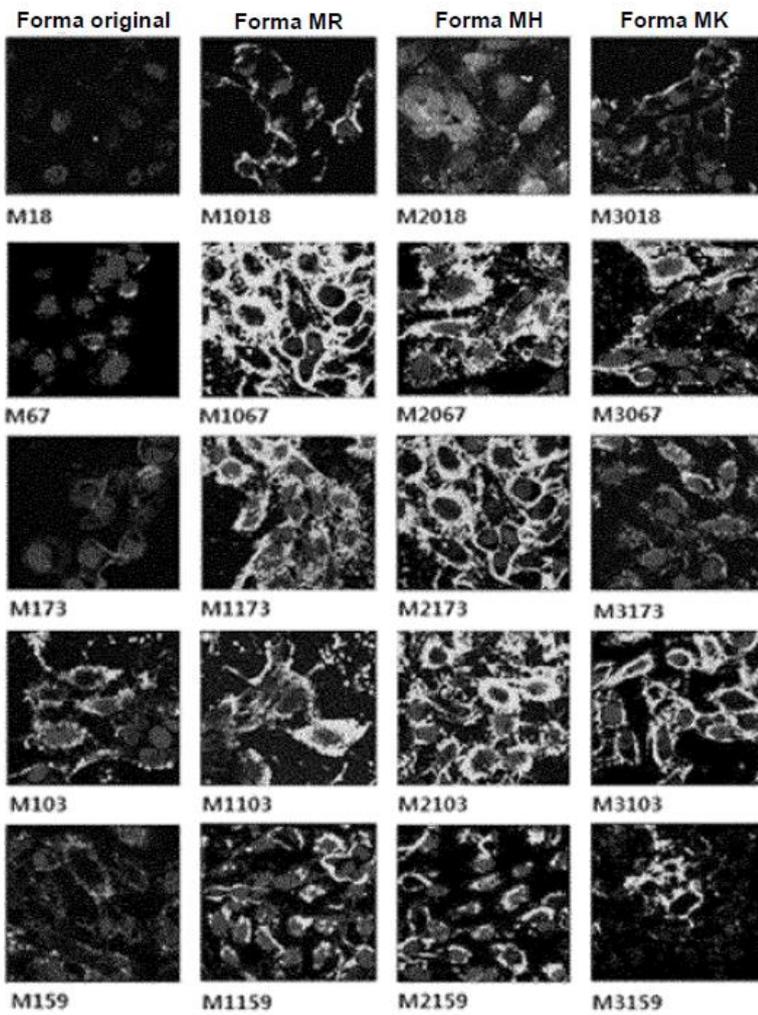


FIG. 8

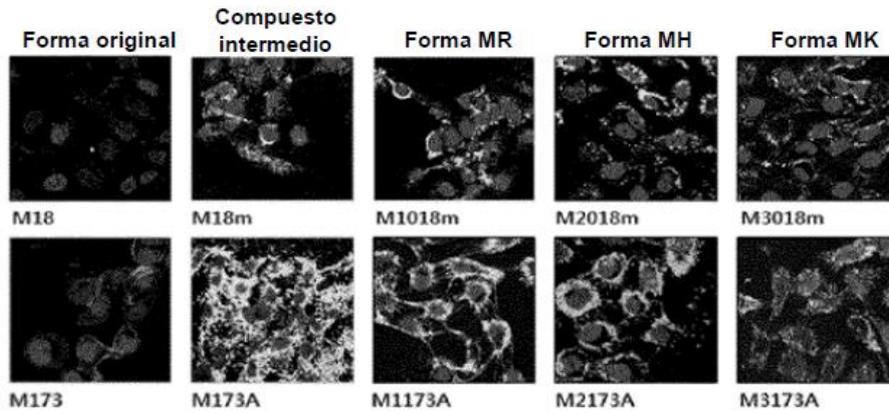


FIG. 9

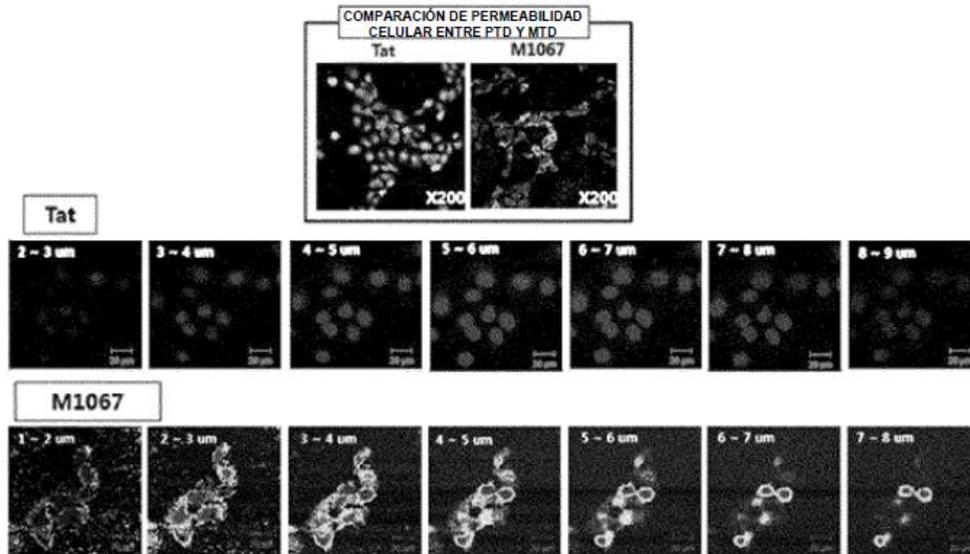
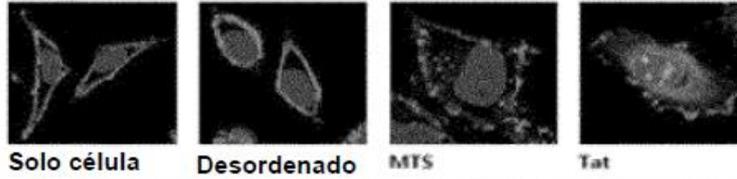


FIG. 10

CONTROL



GRUPOS DE ENSAYO

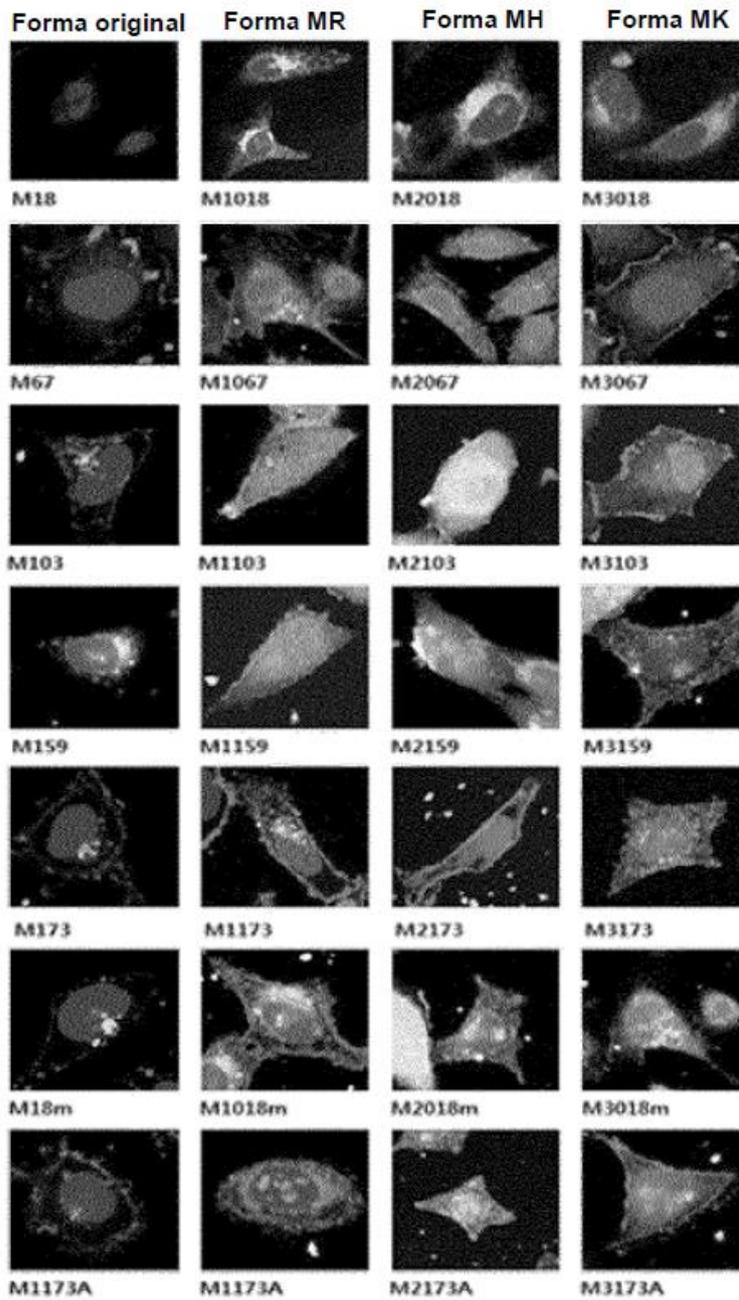


FIG. 11

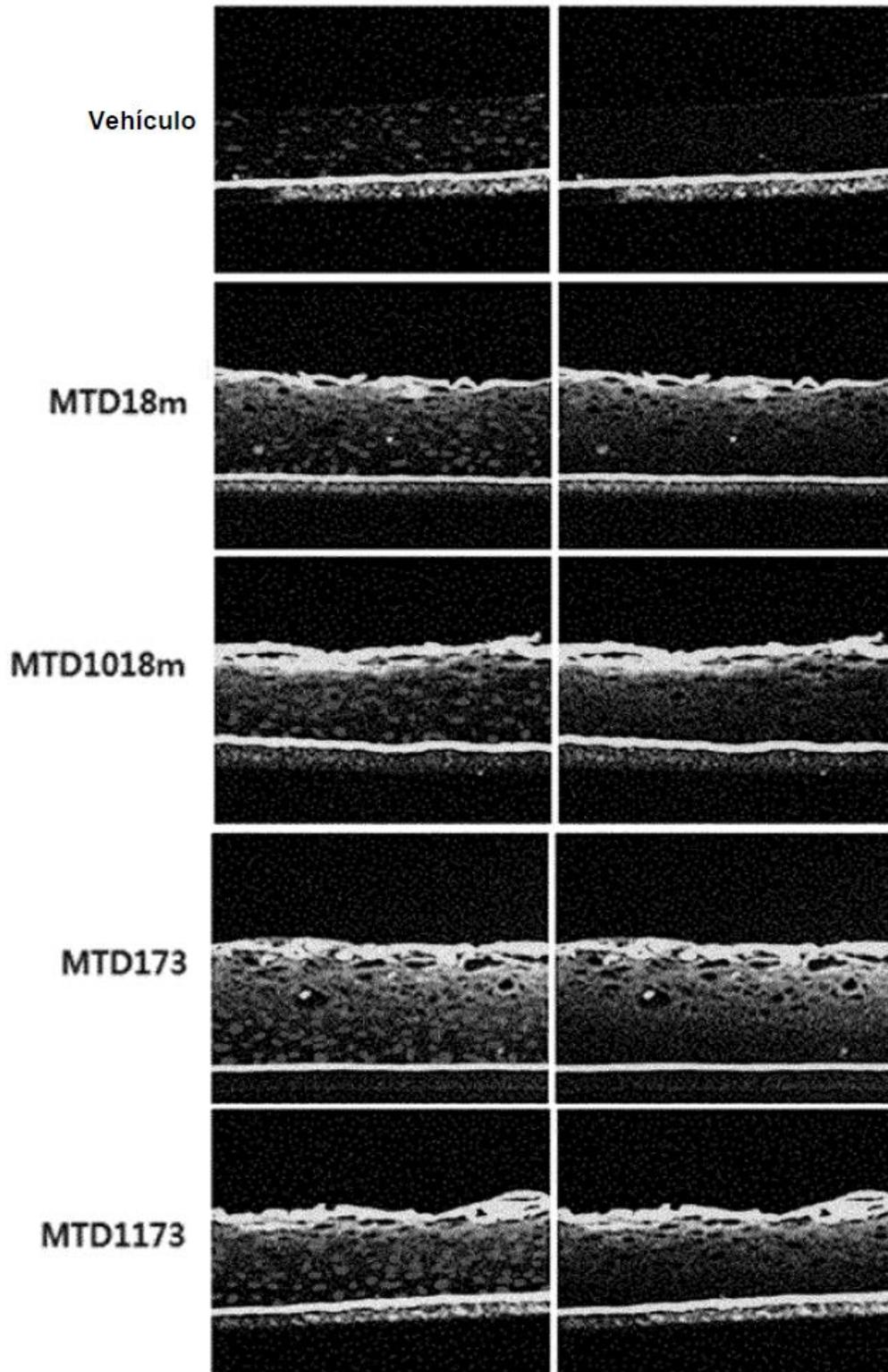


FIG. 12

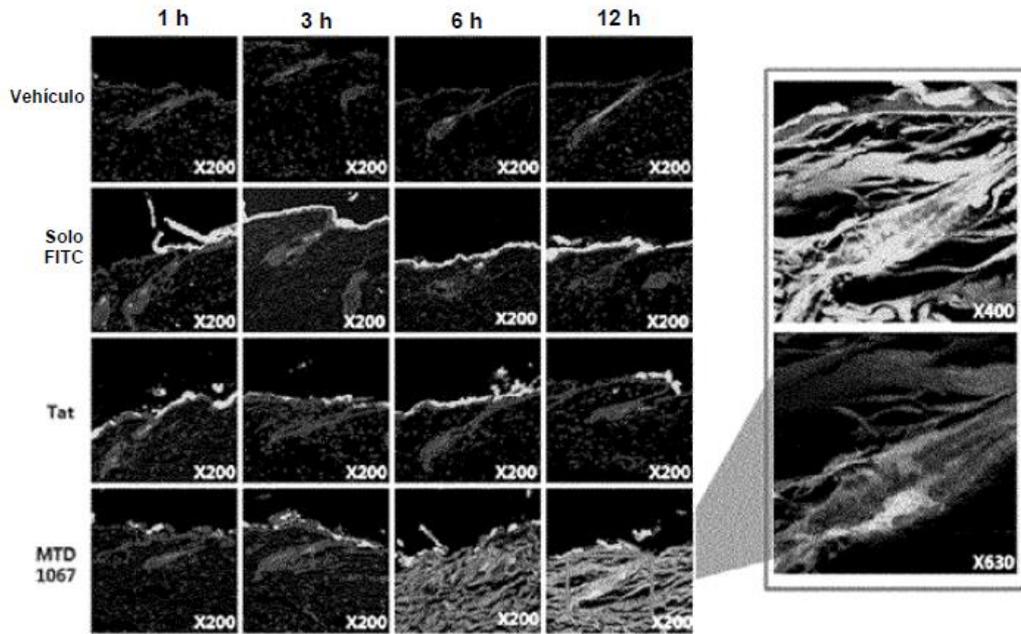


FIG. 13

Línea celular: A375SM; Conc. del tratamiento: 5 μ M; Duración del tratamiento: 6 h

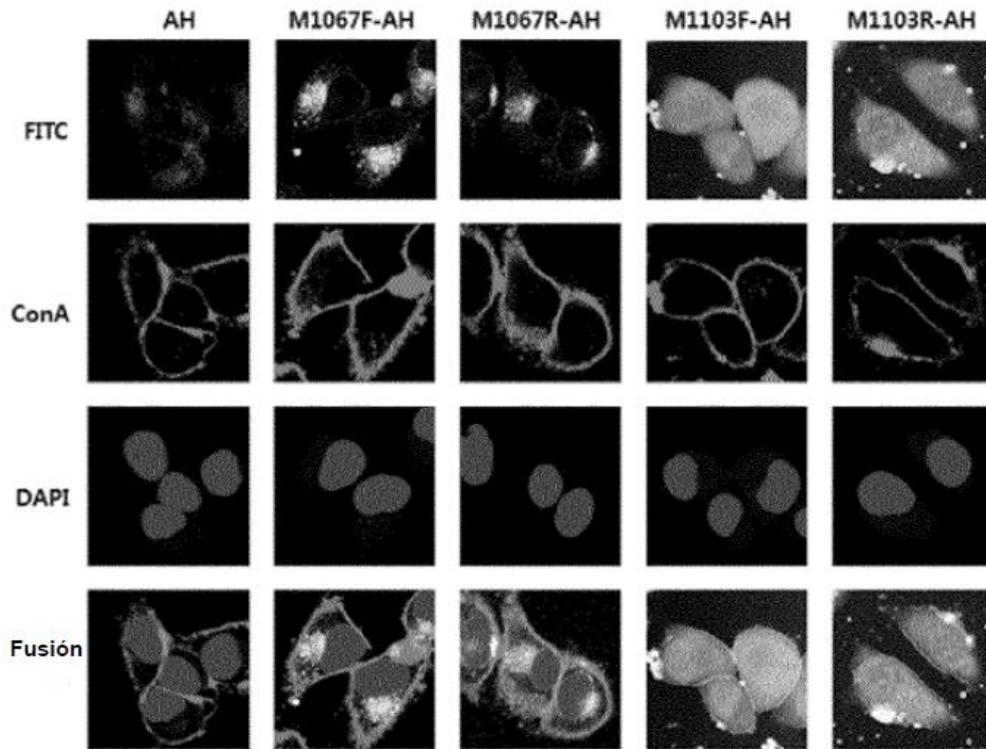
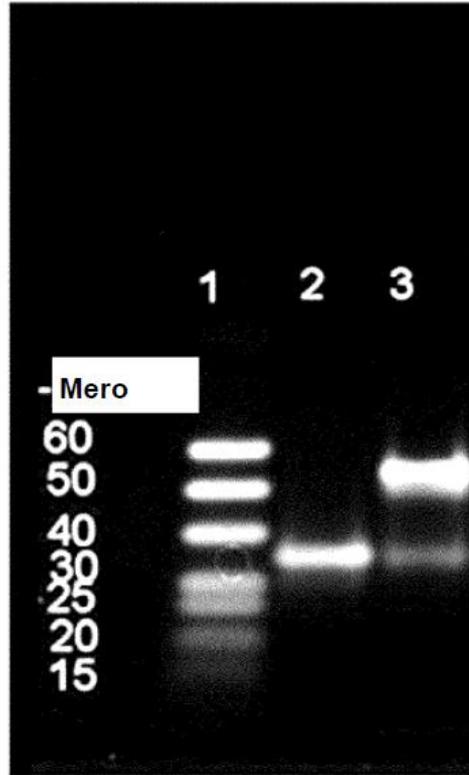


FIG. 14



1. Carril: Patrón de longitud oligo 10/60 de Invitrogen
2. Carril: ARNip de LacZ modificado con sulfo-4FB
3. Carril: Conjugado de ARNip de Lacz con MTD2173A

FIG. 15

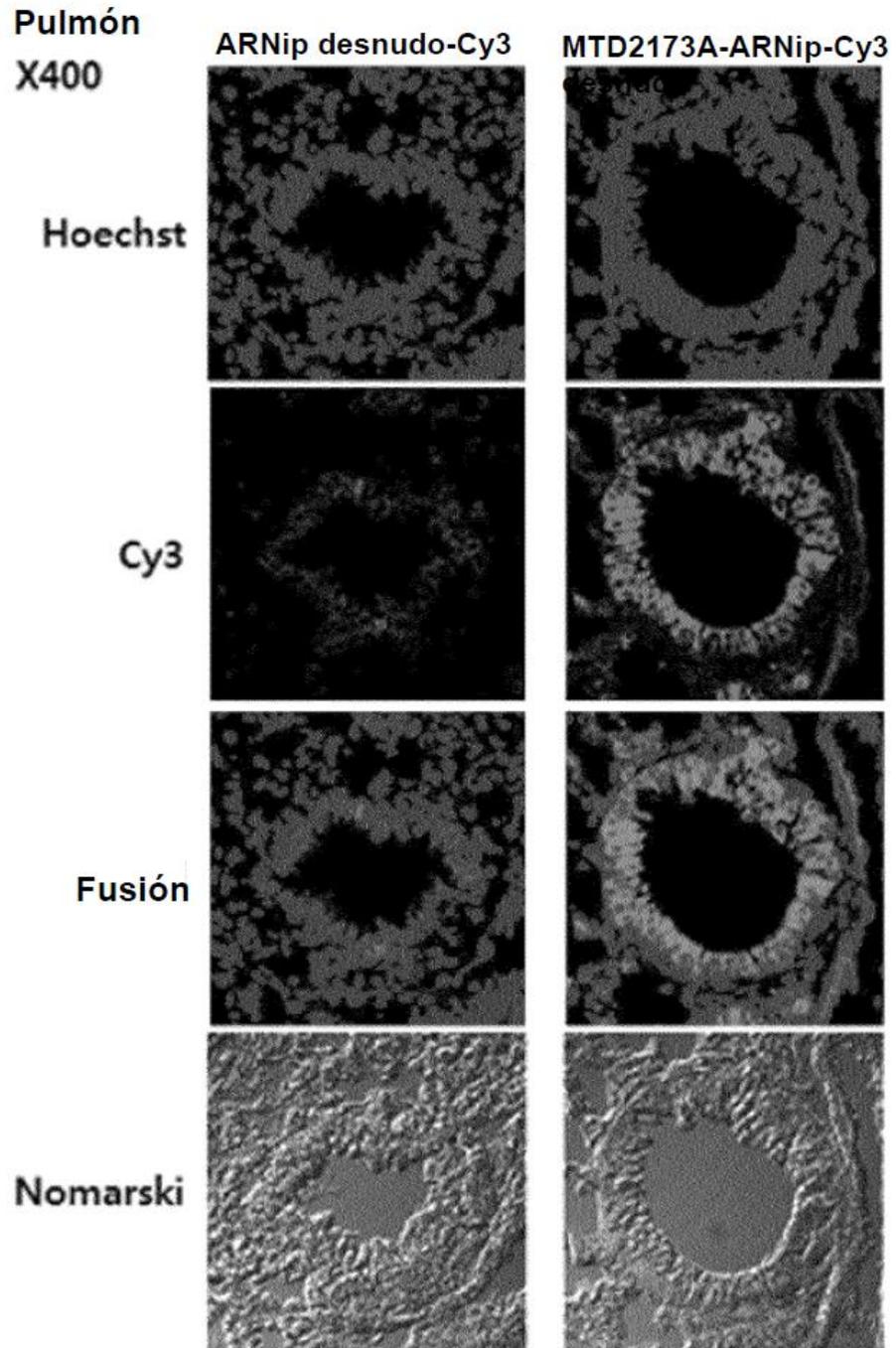


FIG. 16
Tinción con X-gal

