

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 390**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/50** (2007.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012 PCT/EP2012/050513**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12095527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012 E 12704711 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2663336**

54 Título: **Métodos y reactivos para el suministro eficaz y dirigido de moléculas terapéuticas a células CXCR4**

30 Prioridad:

**13.01.2011 EP 11382005**

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

**13.12.2017**

73 Titular/es:

**FUNDACIO INSTITUT DE RECERCA DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU (33.3%)**

**Antoni M<sup>a</sup> Claret, 167**

**08025 Barcelona, ES;**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (33.3%) y**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**VILLAVERDE CORRALES, ANTONIO;**

**VÁZQUEZ GÓMEZ, ESTHER;**

**CÉSPEDES NAVARRO, MARÍA VIRTUDES;**

**CASANOVA RIGAT, ISOLDA;**

**FERRER MIRALLES, NEUS;**

**MANGUES BAFALLUY, RAMON y**

**UNZUETA ELORZA, UGUTZ**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 646 390 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

Métodos y reactivos para el suministro eficaz y dirigido de moléculas terapéuticas a células CXCR4

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a conjugados que comprenden un resto de dirección y un resto terapéutico o de diagnóstico, así como a los usos de los mismos para tratamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

Los receptores de quimiocinas se expresan sobre la superficie de ciertas células, que interactúan con citocinas llamadas quimiocinas. El receptor 4 de quimiocinas CXCR4 es un receptor acoplado a proteína G que transduce señales de su ligando endógeno, la quimiocina CXCL12 (factor 1 derivado de células estromáticas SDF 1). Después de la interacción de CXCR4/CXCL12, se activan los flujos de iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelulares. Esto causa respuestas celulares, incluyendo quimiotaxis que permite que las células viajen dentro del organismo.

CXCR4 se expresa en células mieloides, linfocitos T, linfocitos B, células epiteliales, células endoteliales y células dendríticas. Por tanto, la expresión de esta molécula sobre la superficie de células tumorales hace que sea un buen candidato como ligando para dirigir de forma específica compuestos terapéuticos a células que expresan dicha molécula. Por ejemplo, el documento WO2006029078 describe construcciones de fusión que comprenden un dominio de traslocación de proteínas formado por la proteína Tat, el dominio peptídico DV3 de unión al receptor CXCR4 y un agente terapéutico que es un péptido antagonista de cdk2 o un péptido activador de p53. Estas construcciones se dirigen a las células que expresan CXCR4 y, mediante el dominio de traslocación de proteínas, el agente terapéutico se trasloca al interior de la célula. Sin embargo, estas construcciones requieren, además del ligando de CXCR4 que actúa únicamente en el acoplamiento de la construcción a la célula, un dominio de traslocación que suministra el agente terapéutico al interior de la célula.

Driessen *et al.* (Molecular Therapy, 2008, 16:516-524) describe el uso de un análogo peptídico, 4-fluorobenzoil-RR-(L-3-(2-naftil)alanina)-CYEK-(l-citrulina)-PYR-(l-citrulina)-CR (SEQ ID NO: 1), unido covalentemente a un fosfolípido para dirigir un vehículo de suministro génico basado en lípido a células CXCR4+. Sin embargo, este método muestra una baja eficacia y requiere expresión creciente de CXCR4 en la superficie de las células diana poniendo en contacto las células con VEGF antes del contacto con los conjugados.

Le Bon *et al.* (Bioconjugate Chem. 2004, 15, 413-423) describen el uso de los ligandos específicos de CXCR4 AMD3100 y AMD3100 para promover la transferencia génica específica a células que expresan CXCR4 usando conjugados lipídicos y policatiónicos. Sin embargo, este método requiere la conjugación de un derivado de éster de forbol al agente terapéutico lipídico policatiónico para aumentar la expresión de CXCR4 sobre la superficie de las células diana.

Egorova *et al.* (J Gene Med 2009; 11:772-781) describen conjugados formados por un ligando de CXCR4 (los péptidos KPVLSYRSPSRFFESH-K9-biotina [(SEQ ID NO: 2)-biotina], KPVLSYR-K9-biotina [(SEQ ID NO: 3)-biotina] y D-LGASWHRPDK-K9-biotina [(SEQ ID NO: 4)-biotina] y un ADN que se une a la región de polilisina de forma electrostática y el uso de los mismos para el suministro de ácidos nucleicos a células CXCR4 positivas. Sin embargo, estos conjugados tienen baja eficacia y dependen del uso de péptidos que muestran actividad agonista hacia CXCR4 que pueden provocar una proliferación tumoral aumentada como una respuesta de la estimulación de CXCR4 por los ligandos.

Tamamura *et al.* (Bioinorganic & Medicinal Chemistry, 2001, 9:2179-2187) describen conjugados de diferentes análogos del agonista de CXCR4 T140 y 3'-ácido-3-desoxitimidina (AZT) y su uso para prevenir la citopatogenicidad inducida por VIH 1 en células MT 4. Sin embargo, no se proporcionaron evidencias de que estos conjugados fueran capaces de dirigirse a células que expresan CXCR4 *in vivo* o que la AZT conjugada con el ligando de CXCR4 pueda internalizarse por CXCR4.

Además, todos estos conjugados actúan suministrando el agente terapéutico a la superficie de la célula desde donde la internalización de dicho agente requiere su unión a receptores específicos sobre la superficie celular. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de conjugados adicionales adecuados para el suministro específico de moléculas de interés a células CXCR4 que superen los problemas de los conjugados descrito en la técnica anterior y donde la internalización del agente terapéutico se produzca mediante el uso de una molécula dirigida a CXCR4 que pueda internalizarse por las células que expresan CXCR4 junto con el agente terapéutico unido a la misma.

**Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende

65 (i) un péptido de dirección que comprende la secuencia RRWCYRKCYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 5) o una

variante funcionalmente equivalente del mismo y  
(ii) un agente terapéutico

5 donde el péptido de dirección es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y promover la internalización del agente terapéutico en una célula que expresa CXCR4.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un conjugado de acuerdo con la invención, un vector que comprende dicho polinucleótido y una célula hospedadora que comprende dicho polinucleótido o dicho vector.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un conjugado, un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de acuerdo con la invención para su uso en medicina.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un conjugado, un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de acuerdo con la invención para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, donde dicho cáncer contiene células que expresan CXCR4.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un conjugado, un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con infección por VIH.

### Breve descripción de las figuras

25 **Figura 1. Internalización de las proteínas de fusión T22, vCCL2, V1 y CXCL12-GFP-H6 en células HeLa.** Emisión de proteína fluorescente verde determinada por citometría de flujo, de células HeLa no tratadas y 20 h después de haberse expuesto a 0,6  $\mu\text{M}$  de las proteínas de fusión de ligando de CXCR4-GFP-H6, T22-GFP-H6, V1-GFP-H6, vCCL2-GFP-H6 y CXCL12-GFP-H6 en **A)** PBS + tampón glicerol al 10 % o **B)** en tampón Tris 20 mM + NaCl 500 mM. Las células HeLa obtuvieron un tratamiento prolongado con tripsina (véase la sección experimental) para eliminar la emisión fluorescente residual potencial debido a proteínas de fusión de GFP unidas a la superficie celular definitivas.

35 **Figura 2. Análisis confocal de T22, vCCL2, V1 y CXCL12-GFP-H6 tras internalización en células HeLa.** La membrana celular se marcó con CellMask y se marcó el ADN celular con Hoechst 33342. Las proteínas de fusión de ligando CXCR4-GFP-H6 produjeron una señal verde que puede observarse como puntos intensos dentro de las células. Las células cultivadas se expusieron durante 20 h a 0,6  $\mu\text{M}$  de las proteínas **A)** T22-GFP-H6, **B)** V1-GFP-H6, **C)** vCCL2-GFP-H6 y **D)** CXCL12-GFP-H6 disueltas en PBS + tampón glicerol al 10 %.

40 **Figura 3. Caracterización de la entrada de T22-GFP-H6 en células HeLa.** **A)** Emisión de proteína fluorescente verde determinada por citometría de flujo de células HeLa no tratadas y 20 h después de haberse expuesto a diferentes concentraciones de T22-GFP-H6. **B)** Emisión de proteína fluorescente verde determinada por citometría de flujo de células HeLa 20 h después de exposición a 20  $\mu\text{M}$  de T22-GFP-H6, y con diferentes tratamientos con tripsina antes del análisis de citometría. **C)** Efecto del suero sobre la internalización de T22-GFP-H6 2  $\mu\text{M}$  medida por citometría de flujo y analizada por microscopia confocal en presencia de medio completo (derecha) u Optipro (izquierda), 20 h después de la adición de proteína. **D)** Representación isosuperficial de células HeLa dentro de un campo de datos x-y-z volumétrico 3D después de incubación con T22-GFP-H6 2  $\mu\text{M}$ . **E)** Imágenes TEM de partículas T22-GFP-H6 aleatorias en tampón Tris 20 mM + NaCl 500 mM. **F)** Internalización de T22-GFP-H6 2  $\mu\text{M}$  por microscopia confocal a los 30 min. 1 h. 2 h, 3 h, 4 h y 24 h.

50 **Figura 4. Evaluación de la unión a ADN y propiedades de transferencia génica de T22-GFP-H6.** **A)** Retardo de la migración del ADN plasmídico en electroforesis en gel de agarosa promovido por cantidades crecientes de T22-GFP-H6. **B), C)** y **D)** Microscopia confocal de una célula HeLa con proteína T22-GFP-H6 en el interior (puntos de señales intensas), que expresa el gen de tomate td (señal suave), 24 h después de la exposición al complejo de T22-GFP-H6- gen del tomate td.

55 **Figura 5. Inhibición de la internalización de T22-GFP-H6 por un ligando natural de CXCR4, la proteína SDFalfa, a diferentes relaciones de T22-GFP-H6/SDFalfa (1:0, 1:1, 1:10).** Se usaron dos proteínas irrelevantes GFP-H6 y GLA como controles a una relación de 1:10.

60 **Figura 6. Biodistribución selectiva de T22-GFP, una proteína de fusión que comprende T22 como resto diana (que se une específicamente al receptor CXCR4) y una proteína fluorescente verde, en tejido tumoral primario derivado de células de cáncer colorrectal humano CXCR4+ SW1417 xenotrasplantadas en el ciego de ratones inmunosuprimidos.** Obsérvese la acumulación de 8-47 veces de T22-GFP, medida por cuantificación de la fluorescencia, usando un sistema IVIS200 (Xenogen) a un intervalo de dosis que varía de 20 a 500  $\mu\text{g}$ , en varios puntos temporales (5, 24 o 48 h), después de administración intravenosa de una única dosis. No se detecta fluorescencia en tejido tumoral primario en ratones de control tratados con vehículo. La fluorescencia en el estómago se debe a alimento ingerido, que no difiere entre los animales experimentales y de control. Asterisco negro: tumor

primario.

**Figura 7.** Biodistribución selectiva de T22-GFP en metástasis peritoneales y ganglios linfáticos mesentéricos y diafragmáticos obtenidos de células de cáncer colorrectal humano CXCR4+ SW1417 xenotrasplantadas en el ciego de ratones inmunosuprimidos. Obsérvese la acumulación de 20-40 veces de T22-GFP en focos metastásicos peritoneales, medida por cuantificación de la fluorescencia usando un sistema IVIS200 (Xenogen) a una dosis de 500 ug a las 5 h o 24 h después de administración intravenosa de una única dosis. No se detecta fluorescencia en el parénquima hepático, el parénquima pancreático, el riñón, el corazón, intestino no tumoral, ganglios linfáticos no tumorales, el pulmón o el bazo del animal experimental o de control (control de vehículo). Mientras que se observa acumulación de la proteína de fusión T22-GFP en tejidos tumorales, no se observa acumulación de T22-GFP en tejidos normales. Se observa fluorescencia en la vesícula biliar (adherida al hígado) o en el páncreas de animales tanto experimentales como de control, lo que podría atribuirse a proteínas fluorescentes secretadas por estos órganos. Asterisco negro: tumor primario; flecha negra: metástasis peritoneal.

## Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, un péptido derivado de la secuencia de polifemusina II ([Tyr<sup>5,12</sup>, Lys<sup>7</sup>]-polifemusina II, a partir de ahora péptido T22) es capaz de promover la internalización de compuestos fusionados funcionales y solubles en células diana CXCR4+. Como se muestra, por ejemplo, en los ejemplos de la presente invención, una proteína de fusión que comprende el péptido T22 y una proteína marcadora puede internalizarse y liberarse en el citoplasma. El resultado fue inesperado ya que, aunque este péptido se ha presentado en la técnica anterior como un ligando de CXCR4 (véase, Murakami *et al.* J. Virol., 1999, 73:7489-7496), no se informó de un aumento en las tasas de internalización del receptor como resultado de la unión del péptido al receptor. Los resultados también son sorprendentes ya que la molécula que podía internalizarse cuando estaba acoplada al péptido T22 era un polipéptido de 26 kDa. Este tipo de moléculas, debido a su tamaño relativamente grande, se internalizan con una eficacia muy inferior a la de moléculas orgánicas pequeñas. Además, los experimentos proporcionados en la presente invención ilustran que otros ligandos de CXCR4 de alta afinidad (el péptido V1 correspondiente a la región N-terminal de vCCL2, vCCL2 completo o CXCL12/SDF 1), aunque son capaces de promover la endocitosis del ligando, no daban lugar a escape endosómico de las proteínas adheridas a dicho péptido.

### Conjugados terapéuticos de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende

- (i) un péptido de dirección que comprende la secuencia RRWCYRKCYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 5) o una variante funcionalmente equivalente del mismo y
- (ii) un agente terapéutico

donde el péptido de dirección es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y promover la internalización del agente terapéutico en una célula que expresa CXCR4.

### A. El péptido de dirección

El primer componente de los conjugados de la invención es un péptido de dirección que comprende la secuencia RRWCYRKCYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 5) (a partir de ahora el péptido T22) o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término "péptido", como se usa en este documento, se refiere en líneas generales a una cadena lineal de aproximadamente 2 a 40 restos aminoacídicos unidos juntos con enlaces peptídicos.

Como se usa en este documento un "resto aminoacídico" se refiere a cualquier aminoácido de origen natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier mimético de aminoácido conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, los restos de la proteína o péptidos son secuenciales, sin ningún componente no aminoacídico interrumpiendo la secuencia de restos aminoacídicos. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos no aminoacídicos. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la proteína o péptido puede estar interrumpida por uno o más restos no aminoacídicos.

La expresión "variante funcionalmente equivalente", como se usa en este documento, se refiere a cualquier variante de T22 que contiene inserciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos y que conserva sustancialmente la capacidad de T22 para interactuar con CXCR4 y para promover la internalización y/o escape endosómico de las moléculas terapéuticas adheridas al mismo. Un ensayo adecuado para determinar si un péptido dado puede verse como una variante funcionalmente equivalente del mismo es, por ejemplo, el ensayo descrito en el ejemplo 1 de la presente invención. En este ensayo, una variante funcionalmente equivalente putativa de la variante T22 se fusiona en fase con un polipéptido marcador (por ejemplo, una proteína fluorescente) y se incuba con una célula que expresa CXCR4 (por ejemplo, células HeLa). Si el péptido es una variante funcionalmente

equivalente de T22, la proteína marcadora se internalizará y se expresará en el citosol.

En un ejemplo, el péptido de dirección se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 - el péptido T140 que tiene la secuencia  $RRX_1CYRKX_2PYRX_3CR$  (SEQ ID NO: 6) donde  $X_1$  es L-3-(2-naftil)alanina,  $X_2$  es D-Lys y  $X_3$  es L-citrulina.
- el péptido TN14003 que tiene la secuencia  $RRX_1CYX_2KX_3PYRX_4CR$  (SEQ ID NO: 7) donde  $X_1$  es L-3-(2-naftil)alanina,  $X_2$  es Cit,  $X_3$  es D-Lys y  $X_4$  es L-citrulina,
- 10 - el péptido TC14012 que tiene la secuencia  $RRX_1CYEKX_2PYR.X_3CR$  (SEQ ID NO: 8) donde  $X_1$  es L-3-(2-naftil)alanina,  $X_2$  es d-citrulina y  $X_3$  es L-citrulina,
- el péptido TE14011 que tiene la secuencia  $RRX_1CYX_2KX_3PYR.X_4CR$  (SEQ ID NO: 9) donde  $X_1$  es L-3-(2-naftil)alanina,  $X_2$  es L-citrulina,  $X_3$  es dGlu y  $X_4$  es L-citrulina y
- el péptido TZ14011 que tiene la secuencia  $RRX_1CYX_2KX_3PYR.X_4CR$  (SEQ ID NO: 9) donde  $X_1$  es L-3-(2-naftil)alanina,  $X_2$  es L-citrulina,  $X_3$  es D-Lys y  $X_4$  es L-citrulina o la variante del mismo donde el resto de arginina N-terminal está acetilado (conocido como Ac-TZ14011).

En otra realización, el péptido de dirección es una variante funcionalmente equivalente proporcionada que no es un péptido seleccionado del grupo que consiste en el péptido T140, el péptido TN14003, el péptido TC14012, el péptido TE14011, el péptido TZ14011 o la variante acetilada en el extremo N-terminal de TZ14011 y el péptido T131 que tiene la secuencia  $RRYCYRKX_1PYRKCR$  donde  $X_1$  es D-Lys (SEQ ID NO: 38).

Los expertos en la materia apreciarán que la estructura terciaria de los péptidos de dirección puede depender de la presencia de puentes disulfuro entre los restos de cisteína encontrados en la estructura primaria. En una realización preferida, el péptido T22 contiene al menos un puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 4 y 17. En otra realización preferida, el péptido T22 contiene al menos un puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 8 y 13. En una realización más preferida adicional, el péptido T22 contiene un primer puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 4 y 17 y un segundo puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 8 y 13.

El péptido T22 puede comprender además un resto de metionina en la posición N-terminal.

Las variantes funcionales adecuadas del péptido de dirección son aquellas que muestran un grado de identidad con respecto al péptido T22 de aproximadamente más de un 25 % de identidad de secuencia de aminoácidos, tal como un 25 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP como se describe previamente (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 1990; 215:403-410). Las proteínas de la invención pueden incluir modificaciones postraduccionales, tales como glucosilación, acetilación, isoprenilación, miristoilación, procesamiento proteolítico, etc.

Como alternativa, las variantes funcionales adecuadas del péptido de dirección son aquellas donde una o más posiciones contienen un aminoácido que es una sustitución conservativa del aminoácido presente en la proteína T22 mencionada anteriormente. Las "sustituciones conservativas de aminoácidos" se producen reemplazando un aminoácido con otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares. Por ejemplo, los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). La selección de dichas sustituciones conservativas de aminoácidos pertenece a las habilidades de los expertos en la materia y se describe, por ejemplo, por Dordo *et al.*, (J. Mol. Biol, 1999, 217; 721-739) y Taylor *et al.*, (J. Theor. Biol., 1986, 119:205-218).

El primer componente es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y promover la internalización del segundo componente.

El término "CXCR4", como se usa en este documento, se refiere a un receptor de quimiocinas de siete dominios transmembrana, acoplado a proteína G. Como otros receptores de quimiocinas, CXCR4 desempeña una función importante en respuestas inmunitarias e inflamatorias mediante la migración direccional y la activación de leucocitos. CXCR4 se expresa o sobreexpresa en una diversidad de líneas celulares cancerosas y tejidos incluyendo mama, próstata, pulmón, ovario, colon, pancreático, renal y cerebral, así como linfoma no hodgkiniano y leucemia linfocítica crónica. El único ligando conocido para CXCR4 es el factor 1 derivado de células estromáticas (SDF 1 o CXCL12). La interacción entre CXCR4 y SDF 1 desempeña una función importante en múltiples fases de la tumorigénesis, incluyendo el crecimiento del tumor, la invasión, la angiogénesis y la metástasis.

La afinidad de unión se mide, por ejemplo, como se describe por Tamamura *et al.* por el método de cojín de aceite (véase Hesselgesset *et al.*, 1998, J. Immunol., 160:877-883) que comprende poner en contacto el péptido con una línea celular transfectada con CXCR4 (por ejemplo, células CHO) y un ligando de CXCR4 marcado (por ejemplo,

<sup>125</sup>I-SDF-1 $\alpha$ ) y midiendo el porcentaje de inhibición del péptido de dirección frente a la unión del ligando de CXCR4 marcado.

5 La expresión "que se une específicamente a CXCR4", como se usa en este documento, se refiere a la capacidad de los conjugados de la invención de unirse más frecuentemente, o más rápidamente, con más duración y/o con mayor afinidad a CXCR4 o una célula que expresa el mismo de lo que lo hace con receptores alternativos o células sin unión sustancial a otras moléculas.

10 La afinidad de unión se mide, por ejemplo, como se describe por Tamamura *et al.* por el método de cojín de aceite (véase Hesselgeset *et al.*, 1998, J. Immunol., 160:877-883) que comprende poner en contacto el péptido con una línea celular transfectada con CXCR4 (por ejemplo, células CHO) y un ligando de CXCR4 marcado (por ejemplo, <sup>125</sup>I-SDF-1 $\alpha$ ) y midiendo el porcentaje de inhibición del péptido de dirección frente a la unión del ligando de CXCR4 marcado.

15 La unión específica puede mostrarse, por ejemplo, por un agente de dirección de baja afinidad que tiene una Kd de al menos aproximadamente 10<sup>-4</sup> M, por ejemplo, si CXCR4 tiene más de un sitio de unión para un ligando, un ligando que tiene baja afinidad puede ser útil para el direccionamiento. La unión específica también puede mostrarse por ligandos de alta afinidad, por ejemplo, un ligando que tiene una Kd de al menos aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, de al menos aproximadamente 10<sup>-8</sup> M, de al menos aproximadamente 10<sup>-9</sup> M, de al menos aproximadamente 10<sup>-10</sup> M, o  
20 que puede tener una Kd de al menos aproximadamente 10<sup>-11</sup> M o 10<sup>-12</sup> M o mayor. Los ligandos de dirección tanto de baja como de alta afinidad son útiles para su incorporación en los conjugados de la presente invención.

25 Como se usa en este documento, "internalización" se refiere a un proceso por el que una molécula o una construcción que comprende una molécula se une a un elemento diana en la superficie exterior de la membrana celular y el complejo resultante se internaliza por la célula. La internalización puede estar seguida por la disociación del complejo resultante dentro del citoplasma. El elemento diana, junto con la molécula o la construcción, entonces puede localizarse en un compartimento celular específico.

30 La capacidad del conjugado de la invención de internalizarse por células que expresan CXCR4 puede determinarse convenientemente por métodos de fluorescencia en el caso de que el conjugado comprenda una proteína fluorescente, tal como GFP. Dichas proteínas de fusión pueden obtenerse preparando un ácido nucleico recombinante donde los ácidos nucleicos que codifican el péptido T22 y la proteína fluorescente se fusionan en fase y se expresan en una célula hospedadora u organismo adecuado. La proteína de fusión entonces se pone en  
35 contacto con un cultivo de células que expresan CXCR4 o *in vivo* con un tejido que expresa CXCR4 durante una cantidad apropiada de tiempo, después de lo cual puede usarse la microscopia de fluorescencia para determinar si la construcción ha penetrado en la célula. La presencia de fluorescencia en el citoplasma puede investigarse adicionalmente comparando la imagen de microscopia de fluorescencia resultante de la proteína fluorescente con la obtenida con un tinte citoplasmático conocido.

40 Como alternativa, también es posible ensayar la capacidad del conjugado de la invención de internalizarse por células que expresan CXCR4 preparando complejos no covalentes entre una proteína de fusión que comprende el primer componente del conjugado y un polinucleótido que codifica una proteína fluorescente (por ejemplo, el gen del tomate Td, que codifica una proteína fluorescente roja). El complejo entonces se pone en contacto con un cultivo de células que expresan CXCR4 o *in vivo* con un tejido que expresa CXCR4 durante una cantidad apropiada de tiempo,  
45 después de lo cual puede usarse microscopia de fluorescencia para determinar si la construcción ha penetrado en la célula y se ha expresado el gen que codifica la proteína fluorescente. La presencia de fluorescencia en el núcleo puede investigarse adicionalmente comparando la imagen de microscopio de fluorescencia resultante de la proteína fluorescente con la obtenida con un tinte nuclear conocido (por ejemplo, DAPI).

50 En una realización preferida, el primer componente es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y promover la internalización y el escape endosómico del segundo componente.

55 La expresión "promover el escape endosómico", como se usa en este documento, se refiere a la capacidad del péptido de dirección de inducir la liberación de los conjugados del compartimento endosómico después de la internalización por la endocitosis mediada por el receptor.

#### B. El agente terapéutico

60 El agente terapéutico (también conocido en este documento como segundo componente del conjugado de la invención) es un compuesto de interés terapéutico.

El término "terapéutico" se usa en un sentido genérico e incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de remplazo.

65 La naturaleza del agente terapéutico no es particularmente limitante siempre que pueda conjugarse al péptido de dirección o proporcionarse como un complejo con el péptido de dirección. Por tanto, el agente terapéutico puede ser

un polipéptido o un ácido nucleico. Por tanto, son posibles las siguientes alternativas de agente terapéutico:

- El agente terapéutico es un polipéptido que se asocia al péptido de dirección por un enlace covalente.
- El agente terapéutico es un polipéptido y forma una proteína de fusión con el péptido de dirección.
- El agente terapéutico es un polinucleótido que puede adherirse directamente al péptido de dirección o mediante un dominio de proteína adicional que muestra afinidad por ADN, particularmente por interacción electrostática. Los dominios de proteína adecuados que son capaces de asociarse con el ADN mediante interacción electrostática incluyen, sin limitación, polilisina, protamina, albúmina y albúmina cationizada.
- El agente terapéutico es una molécula orgánica pequeña.
- El agente terapéutico es cualquiera de los anteriores (polipéptido, polinucleótido o molécula orgánica pequeña) que se proporciona dentro de un nanotransportador que se acopla al péptido de dirección.

En una realización preferida, el agente terapéutico es un compuesto de alto peso molecular. Como se usa en este documento, "compuesto de alto peso molecular" se refiere a cualquier entidad química o molécula, tal como ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, polímeros naturales y sintéticos, fármacos tales como antibióticos y similares, que tienen un peso molecular mayor de 1 kDa, preferiblemente mayor de 5 kDa, más preferiblemente mayor de 10 kDa e incluso más preferiblemente mayor de 100 kDa.

#### B.1. Polipéptidos como agentes terapéuticos

En una realización preferida, el agente terapéutico es un polipéptido.

El término "polipéptido", como se usa en este documento, se refiere a un polímero de restos aminoacídicos. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos aminoacídicos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

En el caso de que el agente terapéutico sea un polipéptido, el conjugado puede ser un complejo covalente del agente terapéutico y el péptido de dirección. En otra realización, el agente terapéutico y el péptido de dirección forman una proteína de fusión. Preferiblemente, cuando el agente terapéutico es un polipéptido y el primer y el segundo componente forman una proteína de fusión, entonces el conjugado no es polifemusina-1 o polifemusina-2.

En una realización preferida, el polipéptido que actúa como agente activo o la proteína de fusión formada por dicho polipéptido y el péptido de dirección comprende adicionalmente una marca que puede usarse para la detección o para purificación del conjugado usando reactivos que muestran afinidad específica hacia dichas marcas. Las marcas de detección/purificación adecuadas incluyen Hexa-his (resto de quelato metálico), Hexa-hat GST (glutación S-transferasa), con afinidad por glutación, péptido de unión a calmodulina (CBP), marca estrep., dominio de unión a celulosa, proteína de unión a maltosa, marca de S-péptido, marca de unión a quitina, epítopos inmunorreactivos, marcas epitópicas, marca E2, marca de epítipo HA, epítipo Myc, epítipo FLAG, epítopos AU1 y AU5, epítipo Glu-Glu, epítipo KT3, epítipo IRS, epítipo Btag, epítipo de proteína cinasa-C, epítipo VSV o cualquier otra marca siempre que la marca no afecte a la estabilidad del conjugado o a las capacidad de dirección.

Los polipéptidos adecuados que pueden usarse como agentes terapéuticos incluyen cualquier polipéptido que sea capaz de promover una disminución en las tasas de proliferación celular.

#### B2. Polinucleótidos como agentes terapéuticos

En otra realización, el agente terapéutico que forma parte de los conjugados de la invención es un ácido nucleico. En casos en los que el agente terapéutico es un polinucleótido, este se asocia directamente al péptido de dirección por interacciones en los casos en los que el péptido tiene una carga positiva neta, que permite la formación de interacciones electrostáticas con el ADN. Como alternativa, el péptido de dirección puede comprender un dominio de proteína adicional presente en dicho péptido de dirección que tiene una carga positiva neta y, por tanto, es capaz de formar interacciones electrostáticas con el ADN. Los dominios de proteína adecuados que son capaces de asociarse con el ADN mediante interacción electrostática incluyen, sin limitación, polilisina, protamina, albúmina y albúmina cationizada.

Términos "ácido nucleico" y "polinucleótido", como se usan en este documento de forma intercambiable, se refieren a un polímero compuesto de unidades nucleotídicas (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos de origen no natural sintéticos de los mismos o combinaciones de los mismos) unidos mediante enlaces fosfodiéster, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos de origen no natural sintéticos de los mismos.

Los ácidos nucleicos incluyen regiones codificantes y las señales reguladoras adecuadas para promover la expresión en las células diana en aquellos casos en los que tiene que restablecerse una función génica defectuosa en la célula o un ácido nucleico de silenciamiento en el que tiene que inhibirse la expresión de un gen diana.

En general, los ácidos nucleicos que contienen una región codificante estarán unidos de forma funcional a secuencias reguladoras apropiadas. Dicha secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Como se usa en este documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona controlando la transcripción de uno o más genes, localizado en dirección 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de inicio de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente de ADN, los sitios de inicio de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN incluyendo, aunque sin limitación, sitios de unión al factor de transcripción, sitios de unión a proteína represora y activadora, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida para los expertos en la materia directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción desde el promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de condiciones fisiológicas y del desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado dependiendo de las condiciones fisiológicas o del desarrollo. Un promotor "específico de tejido" es solamente activo en tipos específicos de células diferenciadas/tejidos. Los promotores adecuados para la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido a partir de vectores de terapia génica incluyen, por ejemplo, el promotor temprano intermedio de citomegalovirus (CMV), promotores de la repetición terminal larga vírica (LTR), tales como los del virus de la leucemia murina de Moleney (MMLV), el virus del sarcoma de Rous o HTLV-I, el promotor temprano del virus de simio 40 (SV 40) y el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple.

En aquellos casos en los que el ácido nucleico incluye una región codificante, dicha región codificante se selecciona del grupo que consiste en un gen supresor tumoral, un gen suicida o un polinucleótido que es capaz de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor. Los genes adecuados o ADNc son aquellos que codifican los polipéptidos citotóxicos, proapoptóticos o supresores de metástasis mencionados anteriormente en relación al agente activo que es un polipéptido.

#### B.3. Moléculas orgánicas pequeñas como agentes terapéuticos

En general, una "molécula pequeña" se refiere a un compuesto orgánico sustancialmente no peptídico, no oligomérico preparado en el laboratorio o encontrado en la naturaleza. Las moléculas pequeñas, como se usa en este documento, pueden referirse a compuestos que son "de tipo producto natural" sin embargo, el término "molécula pequeña" no está limitado a compuestos "de tipo producto natural". En su lugar, una molécula pequeña típicamente se caracteriza porque contiene varios enlaces carbono-carbono y tiene un peso molecular de menos de 1500 g/mol, de menos de 1250 g/mol, de menos de 1000 g/mol, de menos de 750 g/mol, de menos de 500 g/mol o de menos de 250 g/mol, aunque esta caracterización no pretende ser limitante para los propósitos de la presente invención. En otras ciertas realizaciones, se utilizan moléculas pequeñas de tipo producto natural.

Las moléculas pequeñas adecuadas que pueden incorporarse en los nanotransportadores que forman parte de los conjugados de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, agentes antineoplásicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos y antirretrovíricos.

#### B.4. Nanotransportadores como agentes terapéuticos

El término "nanotransportador", como se usa en este documento, se refiere a un complejo de múltiples componentes con dimensiones controladas, por ejemplo, un diámetro o radio del orden de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nanómetros que contiene un compuesto de interés.

Los nanotransportadores de acuerdo con la invención pueden incluir uno o más de los agentes activos (polinucleótidos o polipéptidos) mencionados anteriormente, así como cualquier otro agente citotóxico adecuado para disminuir la proliferación celular, incluyendo moléculas pequeñas.

Los nanotransportadores preferidos para su uso en la presente invención incluyen nanopartículas, virus, partículas de tipo virus (VLP), nanopartículas, jaulas de proteínas y similares.

##### *B.4.i. Nanotransportadores basados en nanopartículas*

En otra realización, los nanotransportadores son nanopartículas. Las nanopartículas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen nanopartículas lipídicas, así como nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas se forman por una matriz polimérica que se adhiere al resto de dirección de péptido T22. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en las nanopartículas poliméricas de acuerdo con la presente invención incluyen polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumeratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfazenos, poliácridatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos o poliaminas, poliglutamato, dextrano, polianhídridos, , poliuretanos, polimetacrilatos, poliácridatos o policianoacrilatos. polidioxanona (PDO), polihidroxiálcanoato, polihidroxiacetato, poli(sebacato de glicerol), poliglicólido, poliláctido, PLGA, policaprolactona o combinaciones de los mismos.

Como alternativa, las nanopartículas de la invención pueden ser nanopartículas lipídicas tales como un liposoma o una micela.

La formación de micelas y liposomas a partir de, por ejemplo, lípidos formadores de vesículas, es conocida en la técnica. Los lípidos formadores de vesículas se refieren a lípidos que forman espontáneamente bicapas lipídicas por encima de su intervalo de temperatura de transición de fase cristalina de gel a líquido. Dichos lípidos típicamente tienen ciertas características que permiten la formación espontánea de bicapas, tales como áreas de sección transversal casi idénticas de sus partes hidrófobas e hidrófilas que permiten la compactación en fases laminares. Los lípidos con capacidad de incorporación estable en bicapas lipídicas, tales como el colesterol y sus diversos análogos, pueden incorporarse en la bicapa lipídica durante la formación de la bicapa. Los lípidos formadores de vesículas son preferiblemente lípidos que tienen dos cadenas de hidrocarburo, típicamente cadenas de acilo y un grupo de cabeza, polar o no polar. Hay una diversidad de lípidos formadores de vesículas sintéticos y lípidos formadores de vesículas de origen natural, incluyendo los fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanol, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol y esfingomiélin, donde las dos cadenas de hidrocarburo son típicamente de aproximadamente 14 a 22 átomos de carbono de longitud, y están saturadas o tienen grados variables de insaturación. Los lípidos descritos anteriormente y los fosfolípidos cuyas cadenas acilo tienen grados variables de saturación pueden obtenerse en el mercado o prepararse de acuerdo con los métodos publicados. Otros lípidos adecuados incluyen fosfolípidos, esfingolípidos, glucolípidos y esteroides, tales como colesterol.

El término "liposoma" se refiere a vesículas compuestas por una o más bicapas lipídicas ordenadas de forma concéntrica, que encapsulan una fase acuosa. La fase acuosa típicamente contiene el compuesto a suministrar a un sitio diana. Tras alcanzar un sitio diana, el liposoma se fusiona con las membranas plasmáticas de las células tumorales locales o las células de los vasos sanguíneos tumorales, liberando de ese modo el compuesto en el citosol. Como alternativa, el liposoma se endocita o se recoge de otro modo por las células tumorales o las células de los vasos sanguíneos tumorales como el contenido de una vesícula de transporte (por ejemplo, un endosoma o fagosoma). Una vez en la vesícula de transporte, el liposoma se degrada o fusiona con la membrana de la vesícula y libera sus contenidos. Hay una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la materia disponibles para preparar liposomas, tales como. Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, sonicación, extrusión, alta presión/homogenización, microfluidificación, diálisis con detergente, fusión inducida por calcio de vesículas de liposomas pequeños y métodos de fusión con éter, todos los cuales son conocidos en la técnica.

Los nanotransportadores poliméricos y lipídicos pueden incluir además un recubrimiento de un compuesto amfifilo que rodea el material polimérico que forma una protección para la partícula o un material sigiloso que puede permitir que las partículas evadan el reconocimiento por los componentes del sistema inmunitario y aumentan la semivida en circulación de la partícula.

#### *B.4.ii. Nanotransportadores víricos*

En una realización, el nanotransportador de la invención es un virus. Los expertos en la materia apreciarán que puede usarse cualquier virus conocido en la técnica como nanotransportador en la presente invención, con la condición de que haya suficiente información disponible para permitir la modificación de los componentes externos por el péptido T22 o la variante funcionalmente equivalente del mismo. Por tanto, en el caso de virus sin envuelta, los nanotransportadores de la invención se obtienen modificando directamente al menos una de las proteínas de la cápsida, por acoplamiento químico del péptido T22 o de la variante funcionalmente equivalente del mismo o insertando la secuencia que codifica el péptido T22 o la variante funcionalmente equivalente del mismo en el gen vírico que codifica la proteína de la cápsida de modo que, tras la síntesis y el ensamblaje en la cápsida, el péptido T22 o la variante funcionalmente equivalente del mismo se exponga en la superficie exterior de la cápsida. Los ejemplos de cápsidas víricas adecuadas que pueden modificarse de la manera anterior incluyen, aunque sin limitación, cápsidas del virus Sindbis y otros alfavirus, rhabdovirus (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular), picornavirus (por ejemplo, rinovirus humano, virus Aichi), togavirus (por ejemplo, virus de la rubéola), ortomixovirus (por ejemplo, Thogoto, virus Batken, virus de la peste aviar), polioma virus (por ejemplo, polioma virus BK, polioma virus JC, polioma virus aviar BFDV), parvovirus, rotavirus, bacteriófago Q $\beta$ , bacteriófago P1, bacteriófago M13, bacteriófago MS2, bacteriófago G4, bacteriófago P2, bacteriófago P4, bacteriófago 186, bacteriófago  $\phi$ 6, bacteriófago  $\phi$ 29, bacteriófago MS2, bacteriófago N4, bacteriófago  $\phi$ X174, bacteriófago AP205, virus Norwalk, virus de la fiebre aftosa, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico del mijo satélite (SPMV), virus del rebaño doméstico y papilomavirus humano.

Como alternativa, cuando el nanotransportador es un virus con envuelta, el péptido de dirección se adhiere preferiblemente o se reemplaza una parte de las glucoproteínas de la envuelta. Algunos ejemplos no limitantes de glucoproteínas superficiales que pueden usarse para insertar la proteína de fibra corta incluyen glucoproteínas de alfavirus, tal como el virus Semliki Forest (SFV), el virus Ross River (RRV) y el virus Aura (AV), que comprenden glucoproteínas superficiales tales como E1, E2 y E3. Se usan las glucoproteínas E2 derivadas del virus Sindbis (SIN) y la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe son glucoproteínas no retrovíricas que se unen específicamente a moléculas particulares en las superficies (heparina sulfato glucosaminoglucano para E2, ácido siálico para HA) que se sabe que toleran ciertas modificaciones genéticas y permanecen ensambladas de forma eficaz en la superficie del retrovirus (Morizono et al., J. Virol. 75, 8016-8020); glucoproteínas del virus de la fiebre Lassa, el virus de la

hepatitis B, el virus de la rabia, el virus de la enfermedad Borna, el virus Hantaan o SARS-CoV; glucoproteínas superficiales basadas en flavivirus, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A/peste aviar/Rostock/34 (FPV), fusógeno de clase I, (T. Hatzioannou, S. Valsesia- Wittmann, S. J. Russell, F. L. Cosset, J. Virol. 72, 5313 (1998)).

5 Los virus adecuados para su uso en la presente invención comprenden alfavirus, paramixovirus, rhabdovirus, coronavirus, picornavirus, mixovirus, reovirus, bunyavirus, flavivirus, rubivirus, filovirus, arenavirus, arterivirus o calicivirus.

#### B.4.iii. Nanotransportadores basados en VLP

10 En una realización, el nanotransportador usado en la presente invención es una VLP. La expresión "VLP o partícula de tipo virus", como se usa en este documento, se refiere a una estructura macromolecular de autoensamblaje formada por las nucleocápsidas víricas que adquieren una estructura cuaternaria que se parece a la del virus del que se originan pero que están desprovistas del material genético del virus.

15 Las VLP para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formarse a partir de polipéptidos derivados de cualquier virus conocido en la técnica que tenga una estructura ordenada y repetitiva.

Las VLP pueden producirse y purificarse a partir de cultivo celular infectado por virus. El virus resultante o la partícula de tipo virus con propósitos de vacuna tiene que estar desprovisto de virulencia. Además, de la ingeniería genética, pueden emplearse métodos físicos o químicos para inactivar la función del genoma vírico, tal como radiación UV, tratamiento con formaldehído. Como alternativa, la VLP es una VLP recombinante. Los expertos en la materia apreciarán que casi todos los virus habitualmente conocidos de secuencia conocida pueden usarse para la generación de VLP con la condición de que el gen que codifica la proteína o las proteínas de la envuelta puedan identificarse fácilmente por un experto en la materia. La preparación de VLP por la expresión recombinante de la proteína o proteínas de la envuelta en un hospedador pertenece a los conocimientos habituales de un experto en la materia. Las VLP adecuadas pueden obtenerse a partir de proteínas de la nucleocápsida de un virus seleccionado del grupo que consiste en bacteriófagos ARN, adenovirus, virus del mosaico de la papaya, virus de la gripe, norovirus, papilomavirus, *hepadnaviridae*, virus sincitial respiratorio, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión; virus Sindbis; rotavirus, virus de la fiebre aftosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Norwalk, alfavirus; SARS, paramixovirus, virus de la gastroenteritis transmisible, retrovirus, retrotransposón Ty, polioma virus; virus del mosaico del tabaco; virus del rebaño doméstico, virus del moteado clorótico del caupí; virus del mosaico del caupí; y virus del mosaico de la alfalfa.

#### B.4.iv. Nanotransportadores basados en jaulas de proteínas

35 En otra realización, el nanotransportador usado en la presente invención es una jaula de proteínas. La expresión "jaula de proteínas", como se usa en este documento, se refiere a una estructura macromolecular de autoensamblaje formada por una o más proteínas diferentes que son capaces de formar un entorno interno restringido. Las jaulas de proteínas pueden tener diferentes tamaños de núcleo, que varían de 1 a 30 nm (por ejemplo, el diámetro interno de las cubiertas). Las jaulas de proteínas preferidas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen jaulas de proteína ferritina, jaulas de proteína de choque térmico como se describe en el documento WO08124483 y similares.

#### C. Regiones conectoras

45 Los conjugados que son objeto de la invención que comprenden el péptido de dirección y el agente terapéutico donde dicho agente terapéutico tiene una naturaleza peptídica pueden contener un enlace que conecta directamente el péptido de dirección y el agente terapéutico o, como alternativa, pueden contener una secuencia de aminoácidos adicional que actúa como conector entre el péptido de dirección y el agente terapéutico, el péptido conector preferiblemente comprende al menos 2 aminoácidos, al menos 3 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos.

55 De acuerdo con la invención, dicha secuencia de aminoácidos intermedia no natural actúa como región de bisagra entre los dominios, permitiéndoles moverse independientemente entre sí mientras mantienen la forma tridimensional de los dominios individuales. En este sentido, una secuencia de aminoácidos intermedia no natural preferida de acuerdo con la invención sería una región de bisagra caracterizada por una ductilidad estructural que permite este movimiento. En una realización particular, dicha secuencia de aminoácidos intermedio no natural es un conector flexible no natural. En una realización preferida, dicho conector flexible es un péptido conector flexible con una longitud de 20 aminoácidos o menos. En una realización más preferida, el péptido conector comprende 2 aminoácidos o más seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina. En una realización preferida de la invención, dicho conector flexible es un conector de poliglicina.

65 Los ejemplos preferidos de péptidos espaciadores o conectores incluyen aquellos que se han usado para unir proteínas sin deterioro sustancial de la función de las proteínas unidas o al menos sin deterioro sustancial de la

función de una de las proteínas unidas. Más preferiblemente, los espaciadores o conectores se han usado para unir proteínas que comprenden estructuras con hélices enrolladas tales como:

- el péptido GTKVHMK (SEQ ID NO: 19) formado por los restos 53-56 y los restos 57-59 de tetranectina (Nielsen, B. B. *et al.*, FEBS Lett. 412:388-396, 1997);
- la hebra 3 de conexión de fibronectina humana, correspondiente a los aminoácidos 1992-2102 (numeración SWISSPROT, entrada P02751).
- La subsecuencia PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 20) correspondiente a los números de aminoácidos 2037-2049 de fibronectina y dentro de esa subsecuencia el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 21) correspondiente a los aminoácidos 2038-2042.
- La secuencia de 10 restos aminoácídicos de la región de bisagra superior de IgG3 murina (PKPSTPPGSS, SEQ ID NO: 22). En una realización preferida, el péptido conector se selecciona del grupo del péptido de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 23) y del péptido de secuencia GAP.
- La secuencia de 8 aminoácidos GGSSRSSS (SEQ ID NO: 33).

Como alternativa, los dos componentes de los conjugados de la invención pueden conectarse por un péptido cuya secuencia contiene una diana de escisión para una proteasa, permitiendo por tanto la separación del péptido de dirección del agente terapéutico. Los sitios de escisión por proteasa adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen enterocinasa (sitio de escisión DDDDK, SEQ ID NO: 24), factor Xa (sitio de escisión IEDGR, SEQ ID NO: 25), trombina (sitio de escisión L VPRGS, SEQ ID NO: 26), proteasa TEV (sitio de escisión ENLYFQG, SEQ ID NO: 27), proteasa PreScission (sitio de escisión LEVLFQGP, SEQ ID NO: 28), inteínas y similares.

#### D. Polinucleótidos, vectores y células hospedadoras

En aquellos casos en los que el conjugado es una proteína de fusión del péptido de dirección y el agente activo (terapéutico o de diagnóstico), entonces la proteína de fusión puede producirse *in vivo* por el sujeto destinatario cuando se usa un polinucleótido que codifica la proteína de fusión. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un conjugado de acuerdo con la invención.

Las expresiones "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable en esta invención para hacer referencia a la forma polimérica de ésteres de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquier fosfoéster análogo de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma monocatenaria o bicatenaria. Por tanto, son posibles hélices formadas por ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. La expresión "secuencia de ácido nucleico" y, en particular, molécula de ADN o ARN, se refiere únicamente a la estructura primaria o secundaria de la molécula y no limita ningún tipo particular de estructura terciaria. Por tanto, esta expresión incluye ADN bicatenario y aparece en moléculas de ADN lineales o circulares, plásmidos de ADN superenrollado y cromosomas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención.

Como se usa en esta invención, el término "vector" se refiere a un vehículo por el cual un polinucleótido o una molécula de ADN puede manipularse o introducirse en una célula. El vector puede ser un polinucleótido lineal o circular, o puede ser un polinucleótido de mayor tamaño o cualquier otro tipo de construcción, tal como ADN o ARN de un genoma vírico, un virión o cualquier otra construcción biológica que permita la manipulación de ADN o la introducción del mismo en la célula. Se entiende que las expresiones "vector recombinante", y "sistema recombinante" pueden usarse de forma intercambiable con el término "vector". Los expertos en la materia apreciarán que no hay limitación en los términos del tipo de vector que puede usarse, ya que dicho vector puede ser un vector de clonación adecuado para la propagación y para obtener los polinucleótidos o construcciones génicas o vectores de expresión adecuados en diferentes organismos heterólogos adecuados para la purificación de los conjugados. Por tanto, los vectores adecuados de acuerdo con esta invención incluyen vectores de expresión en procariotas, tales como pUC18, pUC19, Bluescrip y los derivados del mismo, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos y vectores "lanzadera", tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras, tales como los vectores del tipo del plásmido de 2  $\mu$ m, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos de centrómero y similares, vectores de expresión en células de insecto, tales como los vectores de la serie pAC y la serie pVL, vectores de expresión en plantas, tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares, y vectores de expresión en células eucariotas superiores basados en vectores víricos (adenovirus, virus asociados con adenovirus, así como retrovirus y lentivirus) y vectores no víricos, tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

El vector de la invención puede usarse para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de transformarse, transfectarse o infectarse por dicho vector.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende un polinucleótido, una construcción génica o un vector de la invención; para este fin, dicha célula se ha transformado, transfectado o infectado con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Las células transformadas, transfectadas o infectadas pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos para los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 2001, citado *supra*). En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, sin limitación a las mismas, células de mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias. Las células bacterianas incluyen, sin limitarse a las mismas, células de bacterias Gram-positivas, tales como especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, y células de bacterias Gram-negativas, tales como células de los géneros *Escherichia* and *Pseudomonas*. Las células fúngicas incluyen preferiblemente células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Las células de insecto incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Las células vegetales incluyen, entre otras, células de plantas cultivadas, tales como cereales, plantas medicinales, plantas ornamentales o bulbos. Las células de mamífero adecuadas para esa invención incluyen líneas de células epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células de la glía (murinas, etc.), líneas de células hepáticas (de monos, etc.), células CHO (ovario de hámster chino), células COS, células BHK, HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o células PER.C6, células NTERA-2 ECC humanas, células D3 de la líneas mESC, células madre embrionarias humanas, tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, NIH3T3, 293T, REH y células MCF-7 y células hMSC.

#### E. Conjugados de la invención que comprenden agentes antitumorales y usos de los mismos para el tratamiento del cáncer

La interacción eficaz y específica de los conjugados de la invención con células CXCR4+ permite el uso de dichos conjugados para el tratamiento de cualquier enfermedad donde sea deseable suministrar un compuesto de interés a células que expresan CXCR4. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado, un polinucleótido o un vector de acuerdo con la invención donde el agente terapéutico es un agente antitumoral.

La expresión "agente antitumoral", como se usa en este documento, se refiere a cualquier agente químico o biológico o compuesto con propiedades antiproliferativas, antioncogénicas y/o carcinostáticas que puede usarse para inhibir el crecimiento, la proliferación y/o el desarrollo de tumores.

Los agentes antitumorales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación:

- (i) un polipéptido citotóxico,
- (ii) un polipéptido antiangiogénico,
- (iii) un polipéptido codificado por un gen supresor tumoral,
- (iv) un polipéptido codificado por un polinucleótido que es capaz de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor,
- (v) un gen supresor tumoral,
- (vi) un agente de silenciamiento,
- (vii) un gen suicida,
- (viii) un polinucleótido que es capaz de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor,
- (ix) un agente quimioterapéutico y
- (x) una molécula antiangiogénica.

##### *E.1. Polipéptidos citotóxicos*

Como se usa en este documento, la expresión polipéptido citotóxico se refiere a un agente que es capaz de inhibir la función celular. El agente puede inhibir la proliferación o puede ser tóxico para las células. Cualquier polipéptido que, cuando se internaliza por una célula, impide o altera de forma perjudicial el metabolismo celular o inhibe de cualquier manera el crecimiento o proliferación celular se incluyen dentro del ámbito de esta expresión incluyendo, aunque sin limitación, agentes cuyos efectos tóxicos se ven mediados cuando se transportan a la célula y también aquellos cuyos efectos tóxicos se ven mediados en la superficie celular. Los polipéptidos citotóxicos útiles incluyen toxinas proteínicas y toxinas bacterianas.

Los ejemplos de toxinas células proteínicas útiles para su incorporación en los conjugados de acuerdo con la invención incluyen, aunque sin limitación, proteínas de inactivación del ribosoma (RIP) del tipo I y del tipo II. Las RIP vegetales de tipo I útiles incluyen, aunque sin limitación, diantina 30, diantina 32, liquenina, saporinas 1-9, proteína activada por fitolaca (PAP) PAP II, PAP-R, PAP-S, PAP-C, mapalmina, dodecandrina, briodina-L, briodina, colicina 1 y 2, lufina-A, lufina-B, lufina-S, proteína inhibidora de la síntesis de proteínas 19K (PSI), 15K-PSI, 9K-PSI, alfa-kirilowina, beta-kirilowina, gelonina, momordina, momordina-II, momordina-Ic, MAP-30, alfa-momorcarina, beta-momorcarina, tricosantina, TAP-29, tricocirina; RIP de cebada; RIP de lino, tritina, RIP de maíz, asparina 1 y 2 (Stirpe *et al.*, Bio/Technology 10:405-12, 1992). Las RIP de tipo II útiles incluyen, aunque sin limitación, volquensina,

ricina, nigrina-b, CIP-29, abrina, modicina, ebulitina-[alfa], ebulitina-[beta], ebulitina-[gamma], vircumina, porrectina, así como las subunidades enzimáticas biológicamente activas de las mismas (Stirpe *et al.*, Bio/Technology 10:405-12, 1992; Pastan *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; Brinkmann y Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45, 1994; y Sandvig y Van Deurs, Physiol. Rev. 76:949-66, 1996).

Los ejemplos de toxinas bacterianas útiles como toxinas celulares incluyen, aunque sin limitación, toxinas shiga y toxina de tipo shiga (es decir, toxinas que tienen la misma actividad o estructura), así como las subunidades catalíticas y fragmentos biológicamente funcionales de las mismas. Estas toxinas bacterianas también son RIP de tipo II (Sandvig y Van Deurs, Physiol. Rev. 76:949-66, 1996; Armstrong, J. Infect. Dis., 171:1042-5, 1995; Kim *et al.*, Microbiol. Immunol. 41:805-8, 1997, y Skinner *et al.*, Microb. Pathog. 24:117-22, 1998). Los ejemplos adicionales de toxinas bacterianas útiles incluyen, aunque sin limitación, exotoxina de *Pseudomonas* y toxina diftérica (Pastan *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; y Brinkmann y Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45, 1994). También pueden usarse formas truncadas y mutantes de las subunidades enzimáticas de la toxina como un resto de toxina celular (Pastan *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; Brinkmann y Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45, 1994; Mesri *et al.*, J. Biol. Chem. 268:4852-62, 1993; Skinner *et al.*, Microb. Pathog. 24:117-22, 1998; y la patente de Estados Unidos n.º 5.082.927). otros agentes dirigidos incluyen, aunque sin imitación, las más de 34 toxinas de RNasa de la familia de colicina descritas que incluyen colicinas A, B, D, E1-9, cloacina DF13 y la RNasa fúngica, [alfa]-sarcina (Ogawa *et al.* Science 283:2097-100, 1999; Smarda *et al.*, Folia Microbio} (Praha) 43:563-82, 1998; Wool *et al.*, Trends Biochem. Sci., 17:266-69, 1992).

### E.2. Péptidos y polipéptidos antiangiogénicos

La proliferación de células tumorales depende en gran medida de la vascularización extensiva del tumor, que acompaña a la progresión del cáncer. Por tanto, la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos con agentes antiangiogénicos y destrucción dirigida de vasos sanguíneos existentes se ha introducido como estrategia eficaz y relativamente no tóxica para el tratamiento de los tumores.

La expresión "polipéptido antiangiogénico", como se usa en este documento, indica un polipéptido capaz de inhibir la angiogénesis. Los polipéptidos antiangiogénicos adecuados incluyen, sin limitación, angiostatina, endostatina, antitrombina III antiangiogénica, sFRP-4 como se describe en el documento WO2007115376, un anticuerpo anti-VEGF tal como anibizumab, bevacizumab (avastin), Fab IMC 1121 y F200 Fab.

### E.3. Polipéptidos codificados por genes supresores tumores

Como se usa en este documento, un "supresor tumoral" es un gen o producto génico que tiene una función biológica normal de restricción del crecimiento no regulado de una célula. El homólogo funcional a un supresor tumoral es un oncogén. Los genes que promueven el crecimiento de células normales pueden conocerse como "protooncogenes". Una mutación que activa dicho gen o producto génico lo convierte además en un "oncogén", que continúa la actividad de crecimiento celular, pero de una manera no regulada. Los ejemplos de genes supresores tumorales y productos génicos son bien conocidos en la bibliografía y pueden incluir PTC, BRCA1, BRCA2, p16, APC, RB, WT1, EXT1, p53, NF1, TSC2, NF2, VHL, ST7, ST14, PTEN, APC, CD95 o SPARC.

### E.4. Polipéptidos proapoptóticos

La expresión "polipéptidos proapoptóticos", como se usa en este documento, se refiere a una proteína que es capaz de inducir la muerte celular en una célula o población celular. Los polipéptidos proapoptóticos adecuados incluyen, sin limitación, miembros proapoptóticos de la familia BCL-2 de proteínas tales como BAX, BAK, BOK/MTD, BID, BAD, BIK/NBK, BLK, HRK, BIM/BOD, BNIP3, NIX, NOXA, PUMA, BMF, EGL-I, y homólogos víricos, caspasas tales como caspasa-8, el gen E4orf4 de adenovirus, genes de la ruta de p53, ligandos proapoptóticos tales como TNF, FasL, TRAIL y/o sus receptores, tales como TNFR, Fas, TRAIL-R1 y TRAIL-R2.

### E.5. Polipéptidos que tienen actividad antimetastásica

La expresión "supresor de metástasis", como se usa en este documento, se refiere a una proteína que actúa ralentizando o evitando que las metástasis (tumores secundarios) se propaguen en el cuerpo de un organismo con cáncer. El supresor de metástasis adecuado incluye, sin limitación, proteínas tales como BRMS1, CRSP3, DRG1, KAI1, KISS-1, NM23, una proteína de la familia TIMP y uteroglobina.

### E.6. Polipéptidos inmunoestimuladores

Como se usa en este documento, un agente polipeptídico inmunoestimulador es un polipéptido que estimula una respuesta inmunitaria (incluyendo la potenciación de una respuesta inmunitaria preexistente) en un sujeto al que se administra, sea en solitario o en combinación con otro agente, flagelina, muramil dipéptido) citocinas incluyendo interleucinas (por ejemplo IL2, IL7, IL15 (o formas superagonistas/mutantes d estas citocinas), IL-12, IFN-gamma, IFN-alfa, GM-CSF, ligando de FLT3, etc.), anticuerpos inmunoestimuladores (por ejemplo, anti-CTLA-4, anti-CD28, anti-CD3 o fragmentos de cadena sencilla/de anticuerpo de estas moléculas) y similares.

*E.7. Genes supresores tumorales*

Los genes supresores tumorales adecuados incluyen un gen o producto génico que codifica cualquiera de los polipéptidos definidos anteriormente. Los ejemplos de genes supresores tumorales y productos génicos son bien conocidos en la bibliografía y pueden incluir PTC, BRCA1, BRCA2, p16, APC, RB, WT1, EXT1, p53, NF1, TSC2, NF2, VHL, ST7, ST14, PTEN, APC, CD95 o SPARC.

*E.8. Agentes de silenciamiento*

10 Cuando el ácido nucleico es un agente de silenciamiento, dicho agente de silenciamiento tiene como objetivo bloquear la expresión de genes cuya sobreexpresión da lugar a la proliferación celular y al crecimiento tumoral. Los genes que pueden inhibirse por los conjugados de acuerdo con la invención que portan agente de silenciamiento incluyen, sin limitación, HRAS (homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata de Harvey v-Ha-ras), NRAS (homólogo del oncogén vírico RAS de neuroblastoma (v-ras)), KRAS (homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata de Kirsten v-Ki-ras2), MYC (homólogo del oncogén vírico de la mielocitomatosis v-myc, aviar), MYCN (oncogén relacionado con el virus de la mielocitomatosis v-myc, derivado de neuroblastoma, aviar), MYB (homólogo del oncogén vírico de la mieloblastosis v-myb, aviar), oncogén Jun, EOS (homólogo del oncogén vírico del osteosarcoma murino FBJ v-fos). ABL1 oncogénico (homólogo 1 del oncogén vírico de la leucemia murina de Abelson v-abl (este gen es un oncogén solamente si el dominio SH3 está truncado, como sucede normalmente en ciertas leucemias), SRC (homólogo del oncogén vírico de sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) v-src, aviar), FES (oncogén de sarcoma felino), RAF1 (homólogo 1 del oncogén vírico leucemia murina v-raf-1), REE (homólogo del oncogén vírico de la reticuloendoteliosis v-rel, aviar), RELA (homólogo A del oncogén vírico de la reticuloendoteliosis v-rel, factor nuclear del potenciador del gen de polipéptido ligero kappa en linfocitos B 3, p65, aviar), RELB (homólogo B del oncogén vírico de la reticuloendoteliosis v-rel, factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en linfocitos B 3, aviar), FGR (homólogo del oncogén vírico de sarcoma felino de Gardner-Rasheed (v-fgr)) y KIT (homólogo del oncogén vírico de sarcoma felino de Hardy-Zuckerman 4 v-kit).

Otros agentes de silenciamiento adecuados para su uso en la presente invención incluyen los dirigidos contra ciclina G1, ciclina D1, Bcl-2 (proteína 2 asociada a leucemia linfática crónica de linfocitos B), Bcl-XL (gen XL relacionado con Bcl-2), HLA-G (antígeno de leucocitos humanos de clase G), IGF-1 (factor-1 del crecimiento de tipo insulina), EGF (factor del crecimiento epidérmico), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), VEGFR (receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular), IGFR (receptor del factor de crecimiento de tipo insulina), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), FGFR (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos), TGF-beta (factor beta de crecimiento transformante), caspasa 3, CEACAM6 (molécula 6 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario), HPV-E6 (proteína E6 del virus del papiloma humano), HPV-E7 (proteína E7 del virus del papiloma humano), gen H-Ras, gen PI00a, CREB (unión al elemento de respuesta a cAMP), gen BRAF, ATF2 (factor 2 de transcripción activador), HER2 (receptor n.º 2 de tipo EGF humano), y N-myc.

Los ejemplos de moléculas terapéuticas incluyen, aunque sin limitación, agentes de control del ciclo celular; agentes que inhiben las proteínas ciclina, tales como polinucleótidos no codificantes para los genes de ciclina G1 y ciclina D1.

En otra realización, el agente de silenciamiento puede estar dirigido contra CXCR4. Los agentes de silenciamiento de CXCR4 adecuados incluyen, sin limitación:

- Los oligonucleótidos no codificantes para CXCR4 que tienen las secuencias 5'-CTGATCCCCTCCATGGTAACCGCT-3' (SEQ ID NO: 10), 5'-TATATACTGATCCCCTCCATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-CCTCCATGGTAACCGCTGGTTCT-3' (SEQ ID NO: 12) y se describen en el documento US6429308;
- Los ARNip específicos de CXCR4 descritos en el documento W02008008852 que comprenden las hebras codificantes que tienen las secuencias 5'-UAAAUCUUCUGCCACCdTdT-3' (SEQ ID NO: 13) y 5'-GGAAGCUGUUGGCUGAAAAdTdT-3' (SEQ ID NO: 14).
- Los ARN de interferencia específicos de CXCR4 dirigidos a las secuencias dentro del ARNm de CXCR4 descritos en el documento WO2007143584.
- Los ARN de interferencia específicos de CXCR4 dirigidos a las secuencias dentro del ARNm de CXCR4 descritos en el documento US20050124569.
- La ribozima específica de CXCR4 que tiene la secuencia 3'-UGUUGCA-X-Y-X- UCACUC-5' (SEQ ID NO: 15) donde X es las secuencias catalíticas e Y es la secuencia de una región de tallo-bucle. Las estructuras detalladas de esta ribozima y los casetes de ADN que codifican dichas secuencias se describen en el documento US6916653;
- El ARNhc específico de CXCR4 que tiene la secuencia 5'-GATCCGAGGATGGTGGTGGTTTCAATTCCTTCAAGAGAGGAATTGAAACACCACCATCCTTTTTGG-3' (SEQ ID NO: 16) como se describe en el documento US2009210952.
- Los ARNip específicos de CXCR4 dirigidos a las secuencias dentro del ARNm de CXCR4 AATAAAATCTTCTGCCACC (SEQ ID NO: 17) y AAGGAAGCTGTTGGCTGAAAA (SEQ ID NO: 18) como se

describe en el documento W02004087068.

- Los ARN de interferencia específicos de CXCR4 dirigidos a las secuencias dentro del ARNm de CXCR4 descritos en el documento US2009235772 y en el documento US2005124569.

5 Los sitios diana potenciales en el ARNm para el diseño de agentes de interferencia de ARN se identifican basándose en principios de diseño racional, que incluyen accesibilidad a la diana y predicción de la estructura secundaria. Cada uno de estos puede afectar a la reproducibilidad y al grado de inactivación de la expresión de la diana de ARNm, y la concentración de ARNip necesaria para el efecto terapéutico. Además, la estabilidad termodinámica del dúplex de ARNip (por ejemplo, energía de unión del ARNip no codificante, perfiles de estabilidad interna y estabilidad diferencial de extremos dúplex de ARNip) pueden correlacionarse con su capacidad de producir interferencia de ARN. (Schwarz et al., Cell 115:199-208, 2003; Khvorova et al., Cell 115:209- 216, 2003). Las normas empíricas, tales como las proporcionadas por el laboratorio Tuschl (Elbashir et al., Nature 411:494-498, 2001; Elbashir et al., Genes Dev. 15:188-200, 2001) también se usan. Hay disponibles programas informáticos y servicios interactivos de internet para el diseño de ARNip en los sitios web de Ambion e Invitrogen. Levenkova et al., describen un sistema de programa informático para el diseño y priorización de oligos de ARNip (Levenkova et al., Bioinformatics 20:430-432, 2004). El sistema de Levenkova está disponible en internet y se puede descargar libremente tanto con fines académicos como con fines comerciales. Las moléculas de ARNip divulgadas en este documento se basaban en las recomendaciones de Ambion, Invitrogen y Levenkova.

20 Típicamente, los oligos de ARNip específicos para una diana dada se realizan basándose principalmente en la singularidad frente a secuencias humanas (es decir, un único acierto bueno frente a Unigene humano, y una gran diferencia en la temperatura de hibridación Tm frente al segundo mejor acierto) y en el contenido de GC (es decir, secuencias con el porcentaje de GC en el intervalo de un 40-60 por ciento). Opcionalmente, para un cuadro más detallado sobre la hibridación potencial de los oligos, la accesibilidad de la diana de ARN y la predicción de la estructura secundaria pueden realizarse usando, por ejemplo, el programa informático Sfold (Ding Y y Lawrence, C. E. (2004) Rational design of siRNAs with Sfold software. En: RNA Interference: from Basic Science to Drug Development. K. Appasani (Ed.), Cambridge University Press; Ding y Lawrence, Nucleic Acids Res. 29:1034-1046, 2001; Nucleic Acids Res. 31:7280-7301, 2003). Sfold está disponible en internet. La determinación de la estructura secundaria de ARN también se describe en Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucage et al., ed, 2000, en 11.2.1-11.2.10.

El tipo y el modo de acción del agente de silenciamiento no es particularmente limitante en el contexto de la presente invención. Los agentes de silenciamiento adecuados incluyen, sin limitación, ARN o ADN no codificante, ribozimas y otros oligonucleótidos que pretenden usarse como agentes no codificantes. Los agentes de silenciamientos adecuados contra un gen de interés pueden identificarse usando técnicas convencionales para detectar los niveles de expresión de un gen, tal como RT-PCR, transferencia de Northern y similares.

Los oligonucleótidos no codificantes incluyendo, oligonucleótidos no codificantes; moléculas de triple hélice; oligonucleótidos con forma de mancuerna; oligonucleótidos de unión a proteínas extracelulares; y moléculas nucleotídicas pequeñas, son oligonucleótidos que se unen específicamente a ARNm que tiene secuencias complementarias, evitando de ese modo la traducción del ARNm (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.168.053 de Altman et al., la patente de Estados Unidos n.º 5.190.931 de Inouye, la patente de Estados Unidos n.º 5.135.917 de Burch; la patente de Estados Unidos n.º 5.087.617 de Smith y Clusel et al., (1993) Nucl. Acids Res. 21:3405-3411, que describen oligonucleótidos no codificantes con forma de mancuerna). Las moléculas de triple hélice se refieren a hebras de ADN individuales dirigidas a ADN dúplex y de ese modo evitan la transcripción (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.176.996 de Hogan et al., que describe métodos para preparar oligonucleótidos sintéticos que se unen a sitios diana en ADN dúplex).

#### E.9. Genes suicidas

50 En otra realización, el polinucleótido usado como agente activo comprende la región codificante de un gen suicida. La expresión "gen suicida" se refiere a un ácido nucleico que codifica un producto, donde el producto causa la muerte celular por sí mismo o en presencia de otros compuestos. Un ejemplo representativo de un gen suicida es uno que codifica la timidina cinasa del virus del herpes simple. Ejemplos adicionales son la timidina cinasa del virus de la varicela zóster y el gen bacteriano de la citosina desaminasa, que puede convertir la 5-fluorocitosina en el compuesto altamente citotóxico 5-fluorouracilo.

Los genes suicidas pueden producir citotoxicidad convirtiendo un profármaco en un producto que es citotóxico. En una realización, el término "profármaco" significa cualquier compuesto que puede convertirse en un producto tóxico por las células. Los ejemplos representativos de dicho profármaco son ganciclovir que se convierte *in vivo* en un compuesto tóxico por la timidina cinasa de HSV. El derivado de ganciclovir posteriormente es tóxico para las células. Otros ejemplos representativos de profármacos incluyen aciclovir, FIAU [1-(2-desoxi-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo], arabinósido de 6-metoxipurina para VZV-TK y 5-fluorocitosina para citosina desaminasa.

65

*E.10. Polinucleótidos capaces de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor*

Los polinucleótidos adecuados capaces de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor incluyen un gen que codifica cualquier agente polipeptídico inmunoestimulador como se define anteriormente.

*E.11. Agentes quimioterapéuticos*

Como se usa en este documento, un agente antineoplásico es una agente que inhibe al menos parcialmente el desarrollo o la progresión de un cáncer, incluyendo la inhibición de la totalidad o parte de los síntomas asociados con el cáncer incluso si fuera solamente a corto plazo. Pueden clasificarse varios agentes antineoplásicos como agentes que dañan el ADN y estos incluyen inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, rampotecina, topotecán, tenipósido, mitoxantrona), agentes alquilantes del ADN (por ejemplo, cisplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, carmustina, lomustina, carboplatino, dacarbazina, procarbazona), agentes que inducen la rotura de hebra del ADN (por ejemplo, bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina, mitomicina C), agentes anti-microtúbulos (por ejemplo, vincristina, vinblastina), agentes anti-metabolitos (por ejemplo, citarabina, metotrexato, hidroxiurea, 5-fluorouracilo, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, fludarabina, pentostatina, clordesoxiadenosina), antraciclinas, alcaloides de la vinca o epipodofilotoxinas.

Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen sin limitación acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; bortezomib (VELCADE); brequinar sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino (un régimen que contiene platino); carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino (un régimen que contiene platino); cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; diaziquona; docetaxel (TAXOTERE); doxorubicina; droloxifeno; dromostanolona; duazomicina; edatrexato; eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; epirubicina; erbulozol; erlotinib (TARCEVA), esorubicina; estramustina; etanidazol; etopósido; etoprina; fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina; 5-fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina; gefitinib (IRESSA), gemcitabina; hidroxiurea; idarrubicina; ifosfamida; ilfofosina; mesilato de imatinib (GLEEVEC); interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iroplatino; irinotecán; lanreotida; lenalidomida (REVLAMID, REVIMID); letrozol; leuprolida; liarozol; lometrexol; lomustina; losoxantrona; masoprocol; maitansina; mecloretamina; megestrol; melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metoprina; meturedapa; mitinodomida; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamincina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pemetrexed (ALIMTA), pegaspargasa; peliomincina; pentamustina; pentomona; peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; lsetionato de piritrexim; piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer; porfiromincina; prednimustina; procarbazona; puromincina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; semustina; simtrazeno; sitoglusida; esparfosato; esparsomicina; espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tamsulosina; taxol; taxotere; tecogalano; tegafur; teloxantrona; temoporfina; temozolomida (TEMODAR); tenipósido; teroxirona; testolactona; talidomida (THALOMID) y derivados del mismo; tiamicina; tioguanina; tiotepa; tiazoferina; tirapazamina; topotecán; toremifeno; trestolona; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tubulozol; uracilo; mostaza; uredepa; vapreotida; verteporfina; vinblastina; vincristina; vindesina; vinapidina; vinglicinato; vinleurosina; vinorelbina; vinrosidina; vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatino; zorrubicina.

El agente antineoplásico puede ser un inhibidor enzimático incluyendo, sin limitación, inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de CDK, un inhibidor de la MAP cinasa o un inhibidor de EGFR. El inhibidor de tirosina cinasa puede ser, sin limitación, genisteína (4', 5, 7- trihidroxiisoflavona), Tirfostina 25 (3,4,5-trihidroxifenil), metilen]propanedinitrilo, Herbimicina A, Daidzeina (4',7-dihidroxiisoflavona), AG-126, trans-1-(3'-carboxi-4'-hidroxifenil)-2-(2"5"dihidroxifenil)etano o HDBA ácido (2-hidroxi 5-(2,5-dihidroxibencilamino)-2-hidroxibenzoico. El inhibidor de CDK puede ser, sin limitación, p21, p27, p57, p15, p16, p18 o p19. El inhibidor de MAP cinasa puede ser, sin limitación, KY12420 (C23H24O8), CNI-1493, PD98059 o 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfmil fenil)-5-(4-piridil) 1H-imidazol. El inhibidor de EGFR puede ser, sin limitación, erlotinib (TARCEVA), gefitinib (IRESSA), WHI-P97 (derivado de quinazolina), LFM-A12 (análogo de metabolito de leflunomida), ABX-EGF, lapatinib, canertinib, ZD-6474 (ZACTIMA), AEE788 y AG1458.

El agente antineoplásico puede ser un inhibidor de VEGF incluyendo, sin limitación, bevacizumab (AVASTIN), ranibizumab (LUCENTIS), pegaptanib (MACUGEN), sorafenib, sunitinib (SUTENT), vatalanib, ZD-6474 (ZACTIMA), anecortave (RETAANE), lactato de escualamina y semaforina. El agente antineoplásico puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo incluyendo, sin limitación, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo incluyendo, aunque sin limitación, bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), alemtuzumab (CAMPATH), indicado para leucemia linfocítica crónica de linfocitos B), gemtuzumab (MYLOTARG, hP67.6, anti-CD33, indicado para leucemia tal como leucemia mielode aguda), rituximab (RITUXAN), tositumomab (BEXXAR, anti-CD20, indicado para neoplasia de linfocitos B), MDX-210 (anticuerpo biespecifico que se une simultáneamente al producto proteico

del oncogén HER-2/neu y receptores Fc de tipo I para inmunoglobulina G (IgG) (Fc gamma RI), oregovomab (OVAREX, indicado para cáncer de ovario), edrecolomab (PANOREX), daclizumab (ZENAPAX), palivizumab (SYNAGIS, indicado para afecciones respiratorias tales como infección por RSV), ibritumomab tiuxetan (ZEVALINA, indicado para linfoma no de Hodgkin), cetuximab (ERBITEIX), MDX-447, MDX-22, MDX-220 (anti-TAG-72), IOR-C5, 10R-T6 (anti-CD 1), IOR EGF/R3, celogovab (ONCOSCBSFT OV 103), epratuzumab (LYMPHOCIDE), pentumomab (THERAGYN) y gliomab-H (indicado para cáncer cerebral, melanoma).

Otros agentes activos adecuado son agentes de escisión del ADN. Los ejemplos de agentes de escisión del ADN adecuados para su inclusión como toxina celular en los conjugados usados en la práctica de los métodos incluyen, aunque sin limitación, antraquinona-oligopirrol-carboxamida, benzimidazol, leinamicina; dinemicina A; enediína; así como análogos biológicamente activos o derivados de los mismos (es decir, aquellos que tienen una actividad biológica sustancialmente equivalente). Los análogos y derivados conocidos se divulgan, por ejemplo, en Islam et al., J. Med. Chem. 34 2954-61, 1991; Skibo et al., J. Med. Chem. 37:78-92, 1994; Behroozi et al., Biochemistry 35:1568-74, 1996; Helissey et al., Anticancer Drug Res. 11:527-51, 1996; Unno et al., Chem. Pharm. Bull. 45:125-33, 1997; Unno et al., Bioorg. Med. Chem., 5:903-19, 1997; Unno et al., Bioorg. Med. Chem., 5: 883-901, 1997; y Xu et al., Biochemistry 37:1890-7, 1998). Otros ejemplos incluyen, aunque sin limitación, quinona iminas de enediína (patente de Estados Unidos n.º 5.622.958); 2,2r-bis (2-aminoetil)-4-4'-bitiazol (Lee et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 40:151-7, 1996); conjugados de epilicitina-salen.cobre (Routier et al., Bioconjug. Chem., 8: 789-92, 1997).

#### E.12. Moléculas antiangiogénicas

Se contempla que, en ciertas realizaciones de la invención, una proteína que actúa como inhibidor de la angiogénesis se dirija a un tumor. Estos agentes incluyen, además de los polipéptidos antiangiogénicos mencionados anteriormente, marimastat; AG3340; COL-3, BMS-275291, talidomida, endostatina, SU5416, SU6668, EMD121974, 2-metoxiestradiol, carboxiamidotriazol, CM101, polisulfato de pentosano, angiopoyetina 2 (Regeneron), herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP470, endostatina, paclitaxel, accutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor 4 plaquetario o minociclina.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención para su uso en medicina. En otra realización más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un relleno, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo no tóxico, inerte sólido, semisólido o líquido. Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. para Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 divulga diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo las vías oral y parenteral. De acuerdo con dichas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse por inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), por vía rectal, por vía vaginal, por vía tópica (como por polvos, cremas, pomadas o gotas) o por inhalación (como por pulverizadores).

Como CXCR45 se sobreexpresa en una serie de células tumorales, los conjugados de la invención son particularmente útiles para el suministro del compuesto de interés a dichas células tumorales. Si el compuesto activo tiene actividad citostática o citotóxica, entonces los conjugados son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres que sobreexpresan CXCR4.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención o una célula hospedadora de acuerdo con la invención para su uso en un método para el tratamiento de cáncer, donde dicho cáncer contiene células que expresan CXCR4.

Como alternativa, la invención se refiere al uso de un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención o una célula hospedadora de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, donde dicho cáncer contiene células que expresan CXCR4.

Como alternativa, la invención se refiere a un método para el tratamiento en un sujeto del cáncer, donde dicho cáncer contiene células que expresan CXCR4, que comprende la administración a dicho sujeto de un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención o una célula hospedadora de acuerdo con la invención.

"Cáncer que contiene células que expresan CXCR4" incluye, sin limitación, cáncer de ovario, de vejiga, colorrectal,

pulmonar, de cabeza y cuello, renal, de estómago, uterino, leucemia linfoblástica aguda y cervical. En una realización preferida, el cáncer a tratar usando el método de acuerdo con la presente invención es cáncer colorrectal o cáncer pancreático.

5 Como se usa en este documento, la expresión "cáncer colorrectal" incluye cualquier tipo de neoplasia de colon, rectal y del apéndice y se refiere a adenomas tanto prematuros como tardíos y a carcinomas, así como al cáncer hereditario, familiar o esporádico. El CRC hereditario incluye aquellos síndromes que incluyen la presencia de pólipos, tales como los síndromes de poliposis hamartomatoso y la poliposis adenomatosa familiar (FAP) más conocida, así como síndromes sin poliposis tales como cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC) o  
10 síndrome de Lynch I.

En una realización preferida de la invención, dicho cáncer colorrectal (CRC) es cáncer de colon, cáncer rectal y/o cáncer del apéndice vermicular. En otra realización de la invención, dicho cáncer colorrectal es cáncer colorrectal en fase 0, en fase I, en fase II, en fase III y/o en fase IV. Las fases de CRC mencionadas en este documento corresponden a la estadificación del CRC del American Joint Committee on Cancer (AJCC), aunque pueden usarse igualmente otros métodos de estadificación, tales como la estadificación de Dukes y Astler-Coller.

Como se usa en este documento, la expresión "cáncer pancreático" se refiere a una neoplasia maligna del páncreas, incluyendo, aunque sin limitación, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células en anillo de sello, carcinomas hepatoides, carcinomas coloides, carcinomas indiferenciados, carcinomas indiferenciados con gigantocitos de tipo osteoclasto e insulinomas.

Un "sujeto", como se usa en este documento, puede ser un ser humano o un animal no humano. Los animales no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tales como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y murinos, así como reptiles, aves y peces. Preferiblemente, el sujeto es humano.

Por ejemplo, en el caso del tratamiento del cáncer, una respuesta inmunitaria potenciada también podría controlarse observando uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en algún grado del crecimiento del tumor, incluyendo, (i) ralentización (ii) inhibición de la angiogénesis y (iii) detención completa del crecimiento; (2) reducción en la cantidad de células tumorales; (3) mantenimiento del tamaño del tumor; (4) reducción en el tamaño del tumor; (5) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (6) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa de la metástasis; (7) potenciación de la respuesta inmunitaria antitumoral, que puede provocar (i) el mantenimiento del tamaño del tumor, (ii) la reducción del tamaño del tumor, (iii) la ralentización del crecimiento de un tumor, (iv) la reducción, ralentización o prevención de la invasión y/u (8) alivio, en algún grado de la gravedad o cantidad de uno o más síntomas asociados con el trastorno.

Los agentes se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es una dosificación del agente suficiente para proporcionar un resultado medicamente deseable. La cantidad eficaz variará con la afección particular que se está tratando, la edad y estado físico del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concurrente o de combinación (si lo hay), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del facultativo médico. En general, se prefiere usar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el criterio médico sensato. Por ejemplo, si el sujeto tiene un tumor, una cantidad eficaz puede ser esa cantidad que reduce el volumen o carga del tumor (como por ejemplo, determinada por imágenes del tumor). Las cantidades eficaces también pueden evaluarse por la presencia y/o frecuencia de células cancerosas en la sangre u otros líquidos corporales o tejido (por ejemplo, una biopsia). Si el tumor está afectando al funcionamiento normal de un tejido u órgano, entonces la cantidad eficaz puede evaluarse midiendo el funcionamiento normal del tejido u órgano.

50 Lo conjugados se formulan para vías de suministro seleccionadas incluyendo, aunque sin limitación, vía tópica, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, intraperitoneal e intradérmica.

55 F. Conjugados de la invención que comprenden agentes antivíricos y usos de los mismos para el tratamiento de enfermedades causadas por infección por VIH

Como CXCR4 se expresa predominantemente en células CD4+, los conjugados de la invención son particularmente útiles para el suministro del compuesto de interés a dichas células CD4+. Si el compuesto activo tiene actividad antirretrovírica o es capaz de inducir la muerte de las células, los conjugados con particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con una infección por VIH.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención o una célula hospedadora de acuerdo con la invención, donde el agente terapéutico es un agente antirretrovírico.

65 La expresión "agente antirretrovírico", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto que inhibe la

capacidad de un retrovirus de infectar de forma eficaz un hospedador. Los agentes antirretrovíricos pueden inhibir una diversidad de procesos incluyendo la replicación de materiales genéticos víricos o la entrada de los retrovirus en las células. En algunas realizaciones, los agentes antirretrovíricos se seleccionan del grupo que consiste en:

5 En una realización preferida, el compuesto activo es un agente anti-VIH que puede usarse para el tratamiento de una enfermedad asociada con infección por VIH. Los agentes anti-VIH adecuados para su uso como agentes terapéuticos de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, uno o más de los siguientes:

- 10 1) Fármacos de combinación: Efavirenz, emtricitabina o disoproxil fumarato de tenofovir (Atripla(R)/BMS, Gilead); lamivudina o zidovudina (Combivir(R)/GSK); acabavir o lamivudina (Epzicom(R)/GSK); abacavir, lamivudina o zidovudina (Trizivir(R)/GSK); emtricitabina, disoproxil fumarato de tenofovir (Truvada(R)/Gilead).
- 15 2) Inhibidores de la entrada y la fusión: Maraviroc (Celsentri(R), Selzentry(R)/Pfizer); pentafusida o enfuvirtida (Fuzeon(R)/Roche, Trimeris). En algunas realizaciones, el inhibidor de la entrada del virus es un inhibidor de la fusión, un inhibidor de la unión al receptor CD4, es un mimético de CD4 o un mimético de gp120. En algunas realizaciones adicionales, el inhibidor de la entrada del virus es un antagonista de gp41, un anticuerpo monoclonal contra CD4 o un antagonista de CCR5, incluyendo subclases del antagonista de CCR5 tales como, por ejemplo, inhibidores con dedos de zinc. En otra realización más, el inhibidor de la entrada del virus es un antagonista del correceptor CXCR4.
- 20 3) Inhibidores de integrasa: Raltegravir o MK-0518 (Isentress(R)/Merck).
- 4) Inhibidores de la transcriptasa inversa: Los inhibidores adecuados de la transcriptasa inversa para su uso en las composiciones de acuerdo con la presente invención son uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en emtricitabina, capravirina, tenofovir, lamivudina, zalcitabina, delavirdina, nevirapina, didanosina estavudina, abacavir, alovudina, zidovudina, emtricitabina racémica, apricitabina, emivirina, elvucitabina, TMC-278, DPC-083, amdoxovir, (-)-beta-D-2,6-diamino-purina dioxolano, MIV-210 (FLG), DFC (dixelvucitabina), dioxolano timidina, calanolida A, etravirina (TMC-125), L697639, atevirdina (U87201E), MIV-150, GSK-695634, GSK-678248, TMC-278, KP1461, KP-1212, lodenosina (FddA), ácido 5-[(3,5-diclorofenil)thio]-4-isopropil-1-(4-piridilmetil)imidazol-2-metanol carbámico, (-)-I<sup>2</sup>-D-2,6-diaminopurina dioxolano, AVX-754, BCH-13520, BMS-56190 ((4S)-6-cloro-4-[(1E)-ciclopropiletenil]-3,4-dihidro-4-trifluorometil-2(1H)-quinazolinona), TMC-120, y L697639, donde los compuestos están presentes en cantidades eficaces para el tratamiento del VIH cuando se usan en un tratamiento de combinación.
- 25 5) Inhibidores de proteasa: Los inhibidores de proteasa adecuados que pueden combinarse con los miARN o polinucleótidos que codifican miARN de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste en ritonavir, lopinavir, saquinavir, amprenavir, fosamprenavir, nelfinavir, tipranavir, indinavir, atazanavir, TMC-126, darunavir, mozenavir (DMP-450), JE-2147 (AGI 776), L-756423, KNI-272, DPC-681, DPC-684, telinavir (SC-52151), BMS 186318, droxinavir (SC-55389a), DMP-323, KNI-227, 1-[(2-hidroxietoxi)metil]-6-(feniltio)-timina, AG-1859, RO-033-4649, R-944, DMP-850, DMP-851 y brecanavir (GW640385). Los inhibidores de proteasa preferidos para su uso en combinación con un compuesto de la presente invención incluyen saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, darunavir, brecanavir, fosamprenavir y tipranavir. Dichas combinaciones particularmente útiles incluyen, por ejemplo, AZT+3TC; TDF+3TC; TDF+FTC; ABC+3TC; y abacavir+3TC
- 30 35 40

Adicionalmente, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender además un agente antirretrovírico seleccionado del grupo que consiste en vacunas, tratamientos de terapia génica, citocinas, inhibidores de TAT e inmunomoduladores en cantidades eficaces para el tratamiento del VIH cuando se usan en un tratamiento de combinación.

45

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención o una célula hospedadora de acuerdo con la invención, donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en

50

- (i) un agente antirretrovírico,  
 (ii) un polipéptido citotóxico,  
 (iii) un polipéptido proapoptótico  
 55 (iv) un agente de silenciamiento y  
 (v) un gen suicida,

para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con una infección por VIH.

60 Como alternativa, la invención se refiere al uso de un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención, donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en

- (i) un agente antirretrovírico,  
 65 (ii) un polipéptido citotóxico,  
 (iii) un polipéptido proapoptótico

- (iv) un agente de silenciamiento y
- (v) un gen suicida,

para la fabricación de un medicamento para su uso en un método para el tratamiento.

Como alternativa, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con infección por VIH en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración a dicho sujeto de un conjugado de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención, donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en

- (i) un agente antirretrovírico,
- (ii) un polipéptido citotóxico,
- (iii) un polipéptido proapoptótico
- (iv) un agente de silenciamiento y
- (v) un gen suicida.

La expresión "agente retrovírico" se ha definido anteriormente.

Las expresiones "polipéptido citotóxico", "polipéptido proapoptótico", "agente de silenciamiento" y "gen suicida" se han explicado en detalle anteriormente en el contexto de los agentes antitumorales de la invención y se aplican de igual manera en el contexto de los presentes métodos.

Los agentes de silenciamiento adecuados incluyen, sin limitación, construcciones de ARNip para la supresión de la replicación del VIH. Estas construcciones de ARNip pueden ser específicas para diversas dianas de VIH (revisado en Morris (2006) *Gene Ther* 13:553-558; Rossi (2006) *Biotechniques Suppl*: 25-29; Nekhai (2006) *Curr Opin Mol Ther* 8:52-61; y Cullen (2005) *AIDS Rev* 7:22-25). Para evitar la infección por VIH de linfocitos T hospedadores, la invención también caracteriza componentes para disminuir la expresión de correceptores de linfocitos T (por ejemplo, CCR5 y CCR4). Se esperaría que dicha supresión impidiera la infección de linfocitos T hospedadores ya que las personas con la mutación CCR5A32 son resistentes a infección por VIH. La invención también caracteriza la inclusión de múltiples construcciones de ARNip (por ejemplo, construcciones contra genes del VIH y receptores de linfocitos T usados para a infección por VIH). Aquí, una construcción de ARNip puede bloquear la infección y mientras una segunda construcción de ARNip evita la progresión de la infección.

La expresión "enfermedad asociada con infección por VIH", como se usa en este documento, incluye un estado en el que el sujeto ha desarrollado SIDA, así como un estado en que el sujeto infectado con VIH no ha mostrado ningún signo o síntoma de la enfermedad. Por tanto, las composiciones de la invención, cuando se administran a un sujeto que no tiene signos clínicos de la infección, puede tener una actividad preventiva, ya que puede prevenir la aparición de la enfermedad. Las composiciones son capaces de prevenir o ralentizar la infección y destrucción de linfocitos T CD4+ sanos en dicho sujeto. También se refiere a la prevención y ralentización de la aparición de síntomas de la enfermedad de la inmunodeficiencia adquirida, tal como recuento extremadamente bajo de linfocitos T CD4+ e infecciones repetidas por patógenos oportunistas tales como *Mycobacteria spp.*, *Pneumocystis carinii* y *Pneumocystis cryptococcus*. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, un aumento en el recuento absoluto de linfocitos T CD4+ vírgenes (intervalo 10-3520), un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ sobre las células inmunitarias totales en circulación (intervalo 1-50 por ciento) y/o un aumento en el recuento de linfocitos T CD4+ como un porcentaje del recuento normal de linfocitos T CD4+ en un sujeto no infectado (intervalo 1-161 por ciento). "Tratamiento" también puede indicar la prolongación de la supervivencia del sujeto infectado en comparación con la supervivencia esperada si el sujeto no recibiera ningún, tratamiento dirigido a VIH.

La presente invención se refiere además a la prevención o reducción de los síntomas asociados con infección por VIH. Estos incluyen síntomas asociados con la fase sintomática menor de infección por VIH incluyendo, por ejemplo, zóster, erupción cutánea, e infecciones de las uñas, úlceras de boca, infección recurrente en la nariz y la garganta y pérdida de peso. Además, los síntomas adicionales asociados con la fase sintomática principal de infección por VIH incluyen, por ejemplo, afta oral y vaginal (*Candida*), diarrea persistente, pérdida de peso, tos persistente y tuberculosis reactivada o infecciones recidivantes de herpes, tales como herpes labial (herpes simple). Otros síntomas de SIDA en toda regla que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, náuseas y vómitos, aftas y llagas en la boca, infecciones vaginales persistentes, recidivantes y cáncer del cuello del útero, linfadenopatía generalizada persistente (PGL), infecciones graves de la piel, verrugas y tiña, infecciones respiratorias, neumonía, especialmente neumonía por *Pneumocystis carinii pneumonia* (PCP), *herpes zoster* (o zóster), problemas del sistema nervioso, tales como dolores, entumecimiento o "alfileres y agujas" en las manos y los pies, anomalías neurológicas, sarcoma de Kaposi, linfoma, tuberculosis u otras infecciones oportunistas similares.

#### Preparación del conjugado de la invención

Se proporcionan métodos para la preparación de los conjugados. Estos métodos incluyen métodos de conjugación

química y métodos que dependen de la producción recombinante de los conjugados.

El péptido de dirección usado en la práctica de la invención puede adherirse al compuesto activo de interés terapéutico o diagnóstico por modificación química. Típicamente, los métodos químicos dependen de la derivatización del agente activo (terapéutico o de diagnóstico) con el agente de unión deseado, y después reacción con el péptido de dirección. Los métodos químicos de derivatización pueden realizarse usando agentes reticulantes bifuncionales.

En la práctica del método químico, un péptido de dirección que se produce por cualquier medio, típicamente por expresión de ADN en un hospedador bacteriano o eucariota o por síntesis química se acopla químicamente con el agente activo. Si el péptido de dirección o el agente activo no contienen restos adecuados para lograr el enlace químico, puede derivatizarse. Por ejemplo, el agente, tal como toxina shiga, gelonina u otro de dichos agentes, puede derivatizarse tal como por reacción con un agente de unión, tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). En otras realizaciones, el agente dirigido, tal como la cadena A de shiga, se modifica en o cerca del extremo N-terminal para incluir un resto de cisteína, de modo que el agente modificado resultante puede reaccionar con la proteína del resto de unión al receptor de quimiocinas sin derivatización adicional.

Ejemplos no limitantes de posibles grupos químicos implicados en dicha conjugación son: un grupo ácido carboxílico en el péptido de dirección, que podría reaccionar con un grupo amino en el agente activo (por ejemplo, el grupo épsilon-amino en una cadena lateral de lisina) para formar un grupo amida que une el péptido de dirección y el agente activo; un grupo amino en el péptido de dirección, que podría hacerse reaccionar con un grupo ácido carboxílico en el agente activo por ejemplo, el grupo ácido carboxílico en una cadena lateral de glutamato o aspartato) para formar un grupo amida que une el péptido de dirección y el agente activo; un grupo disulfuro en el péptido de dirección, que podría hacerse reaccionar con un grupo tiol en el agente activo (por ejemplo, el grupo tiol en una cadena lateral de cisteína) para formar un grupo disulfuro que une el péptido de dirección y el agente activo.

Una vez conjugado, el conjugado generalmente se purificará para separar el conjugado de los agentes de dirección no conjugados o de otros contaminantes. Hay una gran cantidad de técnicas de purificación disponibles para su uso para proporcionar conjugados de un grado suficiente de pureza para hacerlos clínicamente útiles. Los métodos de purificación basados en la separación por tamaño, tal como filtración en gel, difusión en gel o cromatografía líquida de alto rendimiento, generalmente serán los más útiles. También pueden usarse otras técnicas cromatográficas, tales como separación en Blue-Sepharose.

En ciertas realizaciones, el conjugado es una proteína de fusión del péptido de dirección y el agente terapéutico, en cuyo caso la proteína de fusión o péptido puede aislarse o purificarse. Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas para los expertos en la materia. Estas técnicas implican, a un nivel, la homogeneización y fraccionamiento en bruto de las células, tejido u órgano en las fracciones polipeptídica y no polipeptídica. La proteína o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir la purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por exclusión en gel, electroforesis en gel de poli(acrilamida), cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad y enfoque isoeléctrico. Un método particularmente eficaz de purificación de los péptidos es cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC) o incluso cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Una proteína o péptido purificado pretende hacer referencia a una composición, que se puede aislar de otros componentes, donde la proteína o péptido se purifica en cualquier grado respecto a su estado que se puede obtener de forma natural. Una proteína o péptido aislado o purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o péptido libre del entorno en que puede existir de forma natural. Generalmente, "purificado" hará referencia a una composición de proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificado", esta denominación hará referencia a una composición en que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o más de las proteínas en la composición.

Diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas son bien conocidas para los expertos en la materia. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o por desnaturalización térmica, seguida por: centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, en hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se sabe generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que ciertas etapas pueden omitirse, y aún producir un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

No hay una necesidad general de que la proteína o péptido siempre se proporcione en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos sustancialmente menos purificados tendrán utilidad en ciertas realizaciones. La purificación parcial puede conseguirse usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes

formas del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada usando un aparato de HPLC generalmente producirá una purificación de mayor "factor" que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que muestran un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto de proteína, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

La invención se describe mediante los siguientes ejemplos que deben entenderse como simplemente ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### *Producción y purificación de proteína.*

Se produjeron genes de fusión de GFP por tecnologías convencionales de ADN recombinante, para codificar proteínas híbridas que contenían una marca His en el extremo C-terminal y un ligando de CXCR4 relevante en el extremo amino-terminal. Las proteínas codificadas T22-GFP-H6, V1-GFP-H6, vCCL2-GFP-H6 y CXCL12-GFP-H6 (tabla 2) se produjeron en forma soluble en *Escherichia coli* cepa Origami B (OmpT-, lon-, trxB-, gor- (Novagen)). Las bacterias que portan las diferentes versiones pET22b (Novagen 69744-3) que codifican cada proteína de fusión, se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) y se indujo la expresión de la proteína por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM. Los cultivos bacterianos se centrifugaron y se resuspendieron en tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) en presencia de inhibidor de proteasa sin EDTA (Complete EDTA-Free; Roche). Las células entonces se alteraron por presión de 7584,23 kPa (1100 psi) usando una prensa francesa (Thermo FA-078A).

Las proteínas se purificaron de los extractos celulares en bruto por cromatografía de afinidad con marca 6xHis usando columnas de Ni<sup>2+</sup> de 1 ml HP quelantes HiTrap (GE healthcare) en una FPLC de purificación de AKTA (GE healthcare). Las fracciones positivas se cogieron en tampón de elución (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM), se dializaron frente a PBS + tampones glicerol al 10 % o Tris 20 mM NaCl 500 mM, y se cuantificaron por el procedimiento de Bradford. La integridad de la proteína se caracterizó por espectrometría de masa (MALDI-TOF) y secuenciación N-terminal.

#### *Ensayos de retraso de ADN y microscopia electrónica de transmisión*

Se realizaron ensayos de incubación de ADN-proteína y movilidad de ADN de acuerdo con los protocolos previamente publicados (2) en PBS pH 6 + glicerol al 10 %.

Para la microscopia electrónica de transmisión, se diluyeron proteínas purificadas hasta 0,2 mg/ml de concentración final. Todas las muestras de proteínas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2 % en rejillas recubiertas de carbono. Las muestras también se revistieron depositando una capa de platino de 1 nm sobre las rejillas que contenían las muestras. Todas las muestras se visualizaron en el microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000.

#### *Cultivo celular y microscopia de barrido láser confocal*

Se usó la línea celular HeLa (ATCC-CCL-2) en todos los experimentos y se controló *in vivo*, en ausencia de fijación. Las células se mantuvieron en MEM (GIBCO, Rockville, MD) complementado con suero fetal de ternera al 10 % (GIBCO) y se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en una atmósfera humidificada. Se añadieron las proteínas de fusión de GFP a las concentraciones indicadas al cultivo celular en presencia de medio Optipro (GIBCO, Invitrogen) 20 h antes del análisis confocal, excepto para los estudios de transcurso del tiempo y los estudios de internalización en presencia de suero (medio completo). Para el análisis confocal, las células se cultivaron en placas de cultivo Mat-Teck (Mat Teck Corp., Ashland, Massachusetts, Estados Unidos). Los núcleos se marcaron con 20  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos) y la membrana plasmática se marcó con 2,5  $\mu$ g/ml de rojo profundo CellMask™ (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 5 min. en la oscuridad. Las células se lavaron en PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Las células vivas se registraron con un microscopio de barrido láser confocal TCS-SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) usando un objetivo Plan Apo 63x / 1,4 (aceite HC x PL APO azul lambda). Los marcadores de ADN Hoechst 33342 se excitaron con un diodo azul (405 nm) y se detectaron en el intervalo de 415-460 nm. Las proteínas GFP se excitaron con un láser de Ar (488 nm) y se detectaron en el intervalo de 525-545 nm. CellMask se excitó con un láser HeNe (633 nm) y se detectó en el intervalo de 650-775 nm. Para determinar la localización de las proteínas dentro de la célula, se recogieron apilamientos de 10 a 20 secciones cada una de 0,5  $\mu$ m a lo largo del grosor de la célula. Las proyecciones de la serie obtenida se generaron con el programa informático Leica LAS AF, y se generaron modelos tridimensionales usando el programa informático Imaris v. 6.1.0 (Bitplane; Zúrich, Suiza).

*Transfección plasmídica mediada por proteínas*

Para los experimentos de expresión, se mezclaron 20, 40, 60 y 80 µg de proteína T22-GFP-H6 (1, 2, 3 y 4 unidades de retraso -RU-) y 1 µg del vector de expresión de tomate Td en un volumen final de 85 µl de PBS + tampón glicerol al 10 %, y se formaron complejos después de 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron volúmenes convenientemente de Optipro. El complejo se añadió suavemente a las células HeLa, seguido por incubación durante 24 y 48 h a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. La expresión génica de tomate Td se controló por citometría de flujo y por microscopia confocal. Las células sin tratamiento, o solamente incubadas con el vector de expresión o la proteína en solitario, se usaron como controles.

*Citometría de flujo*

Se analizaron muestras de células después de tratamiento con 0,5 mg/ml de tripsina, 4Na en HBSS durante 1 min. en un sistema FACSCanto (Becton Dickinson), usando un láser de iones de argón refrigerado por aire de 15 mW a 488 nm de excitación. La emisión de fluorescencia se midió con el detector D (filtro de paso de banda de 530/30 nm) para EGFP y el detector C (filtro de paso de banda de 585/42 nm) para la proteína fluorescente de tomate Td. Para ensayar el efecto de los diferentes tratamientos con tripsina publicados (Lundberg, 2003, Mol. Ther., 8:143 y Egorova et al., 2009, J. Gene Med., 11:772) en nuestros resultados de internalización, se usaron 0,5 mg/ml y 1 mg/ml de tripsina con o sin NaCl 1 M durante 1 o 15 min. antes del análisis de citometría.

*Ensayo de competición*

Para evaluar la especificidad de unión de T22-GFP-H6 a CXCR4, se cultivaron células HeLa en una placa de 24 pocillos a una confluencia de un 70 % en un ensayo de competición. Las células se preincubaron durante 30 min. con cantidades crecientes del ligando de CXCR4 natural SDF1alfa en Optipro, hasta alcanzar 25 nM y 250 nM, o con las proteínas irrelevantes GFP-H6 y alfa-galactosidasa humana (ambas a 250 nM). Después, se añadió T22-GFP-H6 a los cultivos a 25 nM y se incubaron adicionalmente. Una hora después, las células se trataron con 1 mg/ml de tripsina durante 15 min. y se determinó la fluorescencia intracelular por citometría de flujo. Los datos se analizaron con los programas informáticos WinMDF, Microsoft Excel 2003 y Sigmaplot 10.

Ejemplo 1

*El péptido T22 es capaz de promover la internalización de proteínas fusionadas funcionales y solubles en células diana CXCR4+.*

En este estudio, se investigaron las propiedades de internalización de cuatro péptidos, ya descritos como ligandos de CXCR4, concretamente T22, V1, vCCL2, CXCL12 (véase la tabla 1). Esto se hizo construyendo cuatro proteínas de modelo en que estos péptidos se habían fusionado a GFP-H6 (tabla 2), haciendo proteínas completamente fluorescentes. Cuando se exponen células HeLa cultivadas a estas construcciones, aquellas en contacto con T22-GFP-H6 se marcaban drásticamente con fluorescencia verde sobre el resto de los péptidos (figuras 1 y 2). Esta captación dependía de la concentración (véase la figura 3A) y se observó incluso después de tratar las células con tripsina después de la unión de las proteínas de fusión para eliminar la proteína adherida superficialmente (figura 3B). Para evaluar que la señal se debía a la captación real de la proteína, células cultivadas se sometieron a análisis confocal, que confirmó la internalización altamente eficaz de T22-GFP-H6, y la mala capacidad de penetración del resto de los péptidos ensayados (figuras 3C, 3D, 3E y F).

Por tanto, el péptido T22 es capaz de promover la internalización de proteínas fusionadas funcionales y solubles en células diana CXCR4+.

Ejemplo 2

*El péptido T22 es capaz de promover la internalización y la expresión de ADN plasmídico en células diana CXCR4+.*

Se determinaron diferentes características biológicas y fisicoquímicas de T22-GFP-H6 por procedimientos alternativos (figura 3). Entre ellos, es notable la localización perinuclear de T22-GFP-H6 y el acoplamiento supuesto de la proteína en la membrana nuclear (figura 3D, véase el recuadro). Esto sugería que, a parte del potencial de T22 en el suministro de proteínas funcionales (en el modelo una GFP completamente fluorescente mostrada en el ejemplo 1), este péptido también podría administrar ADN expresable y finalmente promover su entrada en el compartimento nuclear. Para explorar esta posibilidad, primero se determinó si T22-GFP-H6 podía unirse a ADN plasmídico *in vitro*, lo que se demostró completamente por ensayos de retraso de ADN (figura 4). Además, la expresión génica potencial del gen indicador de *tomate Td*, que codifica una proteína fluorescente roja, se analizó cuando este gen estaba asociado a complejos T22-GFP-H6. El análisis de las células HeLa transfectadas (figuras 4B, 4C y 4D) indicó que el gen indicador se expresa, y se observaba claramente fluorescencia roja (expresión de ADN) y verde (T22-GFP-H6) coincidente en estas células cultivadas.

Ejemplo 3*La internalización de T22-GFP-H6 se inhibe por un ligando natural de CXCR4*

5 Se ensayó la capacidad de un ligando de CXCR4 natural (SDFalfa) de inhibir la internalización de T22-GFP-H6 poniendo en contacto células CXCR4+ con la T22-GFP-H6 en presencia de la proteína SDFalfa, a diferentes relaciones de T22-GFP-H6/SDFalfa (1:0, 1:1, 1:10). Se usaron dos proteínas irrelevantes, GFP-H6 y GLA como  
10 controles a una relación de 1:10. Los resultados demostraron que SDFalfa era capaz de inhibir de una manera dependiente de la dosis la internalización del T22-GFP-H6, mientras que no se observaba efecto con las proteínas no relacionadas (figura 5).

Ejemplo 4*Biodistribución selectiva del T22-GFP-H6 in vivo a tumores primarios*

15 Se administró una proteína de fusión que comprende T22 como resto diana (que se une específicamente al receptor CXCR4) y una proteína fluorescente verde a ratones inmunosuprimidos que contenían un tumor primario resultante del xenotrasplante de células de cáncer colorrectal humano CXCR4+ SW1417 en el intestino ciego de los ratones. La distribución de T22-GFP se determinó en varios puntos temporales (5, 24 o 48 h) después de administración  
20 intravenosa de una única dosis de un intervalo de dosis que varía de 20 a 500 ug. T22-GFP se acumulaba 8-47 veces con respecto a los animales de control, medida por cuantificación de fluorescencia, usando un sistema IVIS200 (Xenogen). No se detecta fluorescencia en tejido tumoral primario en ratones de control tratados con vehículo.

Ejemplo 5*Biodistribución selectiva del T22-GFP a metástasis peritoneal y ganglios linfáticos mesentéricos y diafragmáticos*

30 Se administró una única dosis intravenosa de 500 µg del T22-GFP a ratones que mostraban metástasis peritoneal y ganglios linfáticos mesentéricos diafragmáticos derivados de células de cáncer colorrectal humano CXCR4+ SW1417 xenotrasplantadas en el intestino ciego de ratones inmunosuprimidos. T22-GFP se acumulaba 20-40 veces en los focos metastásicos peritoneales, medida por cuantificación de la fluorescencia usando un sistema IVIS200 (Xenogen) a las 5 h o a las 24 h después. No se detectó fluorescencia en el parénquima hepático, el parénquima pancreático, el riñón, el corazón, intestino no tumoral, ganglios linfáticos no tumorales, pulmón o bazo del animal  
35 experimental o de control (control de vehículo). Mientras que se observaba acumulación de la proteína de fusión T22-GFP en los tejidos tumorales, no se observaba acumulación de T22-GFP en tejidos normales. Se observó fluorescencia en la vesícula biliar (adherida al hígado) o en el páncreas en animales tanto experimentales como de control, lo que podía atribuirse a proteínas fluorescentes secretadas por estos órganos.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas principales de los péptidos usados en este estudio.

Péptido	Secuencia	Unidades	Pm (Da)	P	N	Arg	pl	AI	H	SI
T22	MRRWCYRKYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 29)	19	2623,1	8	0	5	9,96	0	-1,516	39,06 (estable)
VI	MLGASWHRPDKCCLGYQKRPLP (SEQ ID NO: 30)	22	2557	4	1	2	9,38	57,73	-0,705	55,14 (inestable)
vCCL2	MLGASWHRPDKCCLGYQKRPLPQVLLSSW YPTSQLCSKPGVIFLTKRGRQVCADKSKD WVKKLMQQLPVTA (SEQ ID NO: 31)	71	8103,6	12	3	4	9,9	79,58	-0,361	37,48 (estable)
CXCL12	MKPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKI LNTPNCALQIVARLKNNRQVCIDPKLKW IQEYLEKALN (SEQ ID NO: 32)	68	7966,4	12	4	5	9,81	97,5	-0,328	16,24 (estable)

P: Aminoácidos cargados positivamente; N: Aminoácidos cargados negativamente; Arg: Número de restos de arginina; pl: Punto isoeléctrico; AI: Índice alifático; H: Hidrofobicidad; SI: Índice de estabilidad.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas principales de las proteínas de fusión generadas en este estudio.

Proteína de fusión	unidades	Pm (Da)	S (%)	SF (FU/μg Proteína)	P	N	pl	AI	H	SI	TAS	HphoAS	HphiAS	NCP	NCT
T22-GFP-H6 (SEQ ID NO: 34)	269	30691,5	100	13,76 (PBS) 22,8 (Tris)	36	34	8,12	66,99	-0,71	34,18 (estable)	16039	8828	7212	3	0
V1-GFP-H6 (SEQ ID NO: 35)	272	30625,4	100	12,01 (PBS) 12,44 (Tris)	32	35	6,62	70,92	-0,653	35,85 (estable)	14787	8405	6382	-4	-6
vCCL2-GFP-H6 (SEQ ID NO: 35)	321	36172	100	17,15 (PBS) 11,57 (Tris)	40	37	8,38	73,74	-0,585	34,89 (estable)	24780	15428	9353	2	1
CXCL12-GFP-H6 (SEQ ID NO: 37)	318	36034,8	5,33	27,4 (PBS) 14,32 (Tris)	40	38	8,11	77,52	-0,58	29,85 (estable)	17806	10007	7799	0	0

S: Solubilidad; SF: Fluorescencia específica; P: Aminoácidos cargados positivamente; N: Aminoácidos cargados negativamente; pl: Punto isoelectrico; AI: Índice alifático; H: Hidrofobicidad; SI: Índice de estabilidad; TAS: Accesibilidad total al disolvente; HphoAS: Accesibilidad hidrófoba al disolvente; HphiAS: Accesibilidad hidrófila al disolvente; NCP: Carga neta en PBS (pH=7,4); NCT: Carga neta en Tris (pH=8)

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSITÄT AUTÓNOMA DE BARCELONA  
 FUNDACIO PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU  
 CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y NANOCIENCIA  
 (CIBER BBN)

10 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA EL SUMINISTRO EFICAZ Y DIRIGIDO DE MOLÉCULAS  
 TERAPÉUTICAS A CÉLULAS CXCR4

<130> P6461PC00

<160> 38

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Análogo peptídico

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> /reemplaza = "4-fluorobenzoil-arginina"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /reemplaza = "L-3-(2-naftil)alanina"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> /reemplaza = "L-citrulina"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> /reemplaza = "L-citrulina"

45 <400> 1

Xaa	Arg	Xaa	Cys	Tyr	Glu	Lys	Xaa	Pro	Tyr	Arg	Xaa	Cys	Arg
1				5					10				

<210> 2  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido biotinilado en el resto C-terminal

55 <400> 2

Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Pro	Ser	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser
1				5					10					15	
					His	Lys									
							20						25		

60 <210> 3

ES 2 646 390 T3

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Péptido biotinilado en el resto C-terminal

<400> 3

**Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys**  
 1 5 10 15

10

**Lys**

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Péptido biotinilado en el resto C-terminal

20

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (I)..(I)  
 <223> /reemplaza = "D-Leu"

25

<400> 4

**Xaa Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys**  
 1 5 10 15

**Lys Lys Lys**

30

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Secuencia comprendida en el péptido T22

<400> 5

**Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys**  
 1 5 10 15

**Cys Arg**

40

<210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> péptido T140

50

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)



<222> (8)..(8)  
 <223> /reemplaza = "D-citrulina"

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> /reemplaza = "L-citrulina"

10 <400> 8

**Arg Arg Xaa Cys Tyr Glu Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg**  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> péptido TE14011

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /reemplaza = "L-3-(2-naftil)alanina"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> /reemplaza = "L-citrulina"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> /reemplaza = "D-Glu"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> /reemplaza = "L-citrulina"

40 <400> 9

**Arg Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg**  
 1 5 10

45 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido no codificante para CXCR4

<400> 10  
 ctgatcccct ccatggaac cgct 24

55 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido no codificante para CXCR4

<400> 11  
 tatatactga tcccctccat ggta 24

5 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido no codificante para CXCR4

<400> 12  
 cctccatggt aaccgctggt tct 23

15 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> ARNip específico para CXCR4

25 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (20)..(21)  
 <223> /reemplaza = "dT"

<400> 13  
 uaaaaucuuc cugcccacct t 21

30 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> ARNip específico para CXCR4

40 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (20)..(21)  
 <223> /reemplaza = "dT"

<400> 14  
 ggaagcuguu ggcugaaaat t 21

45 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ribozima específica para CXCR4

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> secuencia catalítica

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> región de tallo y bucle

65 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 646 390 T3

<222> (9)..(9)  
 <223> secuencias catalíticas

5 <400> 15  
 cucacunnna cguugu 16

10 <210> 16 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ARNhc específico para CXCR4

15 <400> 16  
 gatccaggat ggtgggtgtt caattccttc aagagaggaa ttgaaacacc accatccttt 60  
 ttgg 64

20 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> segmento de secuencia de ADNc de CXCR4

<400> 17  
 aataaaatct tcctgccac c 21

30 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> segmento de secuencia de ADNc de CXCR4

<400> 18  
 aaggaagctg ttgctgaaa a 21

40 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> péptido formado por los restos 53-56 y los restos 57-59 de tetranectina

<400> 19

50 Gly Thr Lys Val His Met Lys  
 1 5

55 <210> 20  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Subsecuencia correspondiente a los números de aminoácido 2037-2049 de fibronectina

60 <400> 20

Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln  
 1 5 10



ES 2 646 390 T3

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sitio de escisión de trombina

<400> 26

**Leu Val Pro Arg Gly Ser**  
**1 5**

10

<210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Sitio de escisión de proteasa TEV

20

<400> 27

**Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly**  
**1 5**

25

<210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Sitio de escisión de proteasa PreScission

<400> 28

**Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro**  
**1 5**

35

<210> 29  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> péptido T22

<400> 29

45

**Met Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg**  
**1 5 10 15**

**Lys Cys Arg**

50

<210> 30  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> péptido VI

<400> 30

ES 2 646 390 T3

Met Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Cys Cys Leu Gly Tyr  
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Pro Leu Pro  
 20

5 <210> 31  
 <211> 71  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido vCCL2

<400> 31

Met Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Cys Cys Leu Gly Tyr  
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Pro Leu Pro Gln Val Leu Leu Ser Ser Trp Tyr Pro Thr  
 20 25 30

Ser Gln Leu Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly  
 35 40 45

Arg Gln Val Cys Ala Asp Lys Ser Lys Asp Trp Val Lys Lys Leu Met  
 50 55 60

Gln Gln Leu Pro Val Thr Ala  
 65 70

15 <210> 32  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> péptido CXCL12

<400> 32

ES 2 646 390 T3

Met Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu  
 1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr  
 20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg  
 35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu  
 50 55 60

Lys Ala Leu Asn  
 65

5 <210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Región conectora  
 <400> 33

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser  
 1 5

15 <210> 34  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> T22-GFP-H6  
 <400> 34

ES 2 646 390 T3

Met Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg  
 1 5 10 15

Lys Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Lys Gly Glu Glu Leu  
 20 25 30

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn  
 35 40 45

Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr  
 50 55 60

Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val  
 65 70 75 80

Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe  
 85 90 95

Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala  
 100 105 110

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp  
 115 120 125

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu  
 130 135 140

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn  
 145 150 155 160

Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr  
 165 170 175

Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile  
 180 185 190

Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln  
 195 200 205

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His  
 210 215 220

ES 2 646 390 T3

Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg  
225 230 235 240

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His  
245 250 255

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys His His His His His His  
260 265

5 <210> 35  
<211> 271  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> V1-GFP-H6  
<400> 35

ES 2 646 390 T3

Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Cys Cys Leu Gly Tyr Gln  
 1 5 10 15

Lys Arg Pro Leu Pro Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Lys Gly Glu  
 20 25 30

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp  
 35 40 45

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala  
 50 55 60

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu  
 65 70 75 80

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln  
 85 90 95

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe Lys  
 100 105 110

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys  
 115 120 125

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp  
 130 135 140

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp  
 145 150 155 160

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn

ES 2 646 390 T3

					165						170					175	
Val	Tyr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe		
			180					185					190				
Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His		
		195					200					205					
Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp		
	210					215					220						
Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu		
225					230					235					240		
Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile		
				245					250					255			
Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	His	His	His	His	His	His			
			260					265						270			

<210> 36  
 <211> 320  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> vCCL2-GFP-H6

10

<400> 36

Leu	Gly	Ala	Ser	Trp	His	Arg	Pro	Asp	Lys	Cys	Cys	Leu	Gly	Tyr	Gln
1				5					10					15	
Lys	Arg	Pro	Leu	Pro	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	Pro	Thr	Ser
			20					25					30		
Gln	Leu	Cys	Ser	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Arg	Gly	Arg
		35				40						45			
Gln	Val	Cys	Ala	Asp	Lys	Ser	Lys	Asp	Trp	Val	Lys	Lys	Leu	Met	Gln
	50					55					60				
Gln	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Lys	Gly
65					70					75					80
Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly
				85					90					95	
Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp
			100					105					110		

ES 2 646 390 T3

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys  
 115 120 125

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val  
 130 135 140

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe  
 145 150 155 160

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe  
 165 170 175

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly  
 180 185 190

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu  
 195 200 205

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His  
 210 215 220

Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn  
 225 230 235 240

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp  
 245 250 255

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro  
 260 265 270

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn  
 275 280 285

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly  
 290 295 300

Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys His His His His His His  
 305 310 315 320

<210> 37  
 <211> 318  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> CXCLI2-GFP-H6

10

<400> 37



ES 2 646 390 T3

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr  
20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg  
35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu  
50 55 60

Lys Ala Leu Asn Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Lys Gly Glu Glu  
65 70 75 80

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val  
85 90 95

Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr  
100 105 110

Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro  
115 120 125

Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys  
130 135 140

Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe Lys Ser  
145 150 155 160

Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp  
165 170 175

Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr  
180 185 190

Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly  
195 200 205

Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val  
210 215 220

Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys  
225 230 235 240

Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr  
245 250 255

Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn  
260 265 270

ES 2 646 390 T3

His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys  
275 280 285

Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr  
290 295 300

His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys His His His His His His  
305 310 315

5 <210> 38  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> péptido TZ14011

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (8)..(8)  
<223> /reemplaza = "D-Lisina"

15 <400> 38

Arg Arg Tyr Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Lys Cys Arg  
1 5 10

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un conjugado que comprende
  - 5 (i) un péptido de dirección que comprende la secuencia RRWCYRKCYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 5) o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicha variante funcionalmente equivalente muestra un grado de identidad de secuencia con respecto a dicha secuencia mayor de un 70 % y
  - (ii) un agente terapéutico
- 10 en el que el péptido de dirección es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y promover la internalización del agente terapéutico en una célula que expresa CXCR4.
2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido de dirección consiste en la secuencia RRWCYRKCYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 5).
- 15 3. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido y un polinucleótido o en el que el agente terapéutico se proporciona dentro de un nanotransportador y en el que el nanotransportador se acopla al péptido de dirección.
- 20 4. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente terapéutico es un polipéptido y en el que el polipéptido y el péptido de dirección son parte de una proteína de fusión.
5. Un polinucleótido que codifica un conjugado como se define en la reivindicación 4 o un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conjugado como se define en la reivindicación 4.
- 25 6. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un polinucleótido o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico es un agente antitumoral.
- 30 7. Un conjugado, polinucleótido o vector de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en
  - (i) un polipéptido citotóxico,
  - (ii) un polipéptido antiangiogénico,
  - 35 (iii) un polipéptido codificado por un gen supresor tumoral,
  - (iv) un polipéptido proapoptótico,
  - (v) un polipéptido que tiene actividad antimetastásica,
  - (vi) un polipéptido codificado por un polinucleótido que es capaz de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor,
  - (vii) un gen supresor tumoral,
  - 40 (viii) un agente de silenciamiento,
  - (ix) un gen suicida,
  - (x) un polinucleótido que es capaz de activar la respuesta inmunitaria contra un tumor,
  - (xi) un agente quimioterapéutico y
  - 45 (xii) una molécula antiangiogénica.
8. Un conjugado, polinucleótido o vector de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el agente de silenciamiento se selecciona del grupo de un ARNip, un ARNhc y un oligonucleótido no codificante.
9. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un polinucleótido o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en medicina.
- 50 10. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un polinucleótido o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en el que dicho cáncer contiene células que expresan CXCR4.
- 55 11. Un conjugado, polinucleótido o vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el cáncer es cáncer pancreático o colorrectal.
12. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un polinucleótido o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico es un agente antirretrovírico.
- 60 13. Un conjugado, polinucleótido o vector de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en medicina.
14. Un conjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un polinucleótido o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en
- 65

- (i) un agente antirretrovírico,
- (ii) un polipéptido citotóxico,
- (iii) un polipéptido proapoptótico,
- (iv) un agente de silenciamiento y
- (v) un gen suicida,

5

para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con una infección por VIH.

15. Uso de un conjugado de agente que comprende

10

- (i) un péptido de dirección que comprende la secuencia RRWCYRKCYKGYCYRKCR (SEQ ID NO: 5) o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicha variante funcionalmente equivalente muestra un grado de identidad de secuencia con respecto a dicha secuencia mayor de un 70 % y
- (ii) un agente terapéutico

15

en el que el péptido de dirección es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y promover la internalización del agente terapéutico en una célula que expresa CXCR4 para el suministro *in vitro* del agente terapéutico al interior de una célula que expresa CXCR4.

20

Proteína en PBS + tampón glicerol al 10 % a 0,6  $\mu$ M

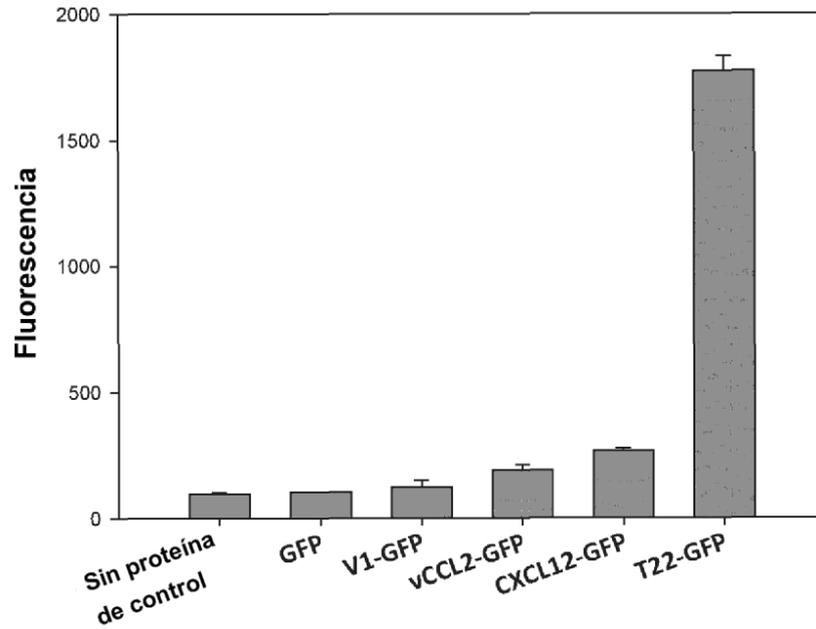


FIG. 1A

Proteína en tampón Tris 20 mM + NaCl 500 mM a 0,6  $\mu$ M

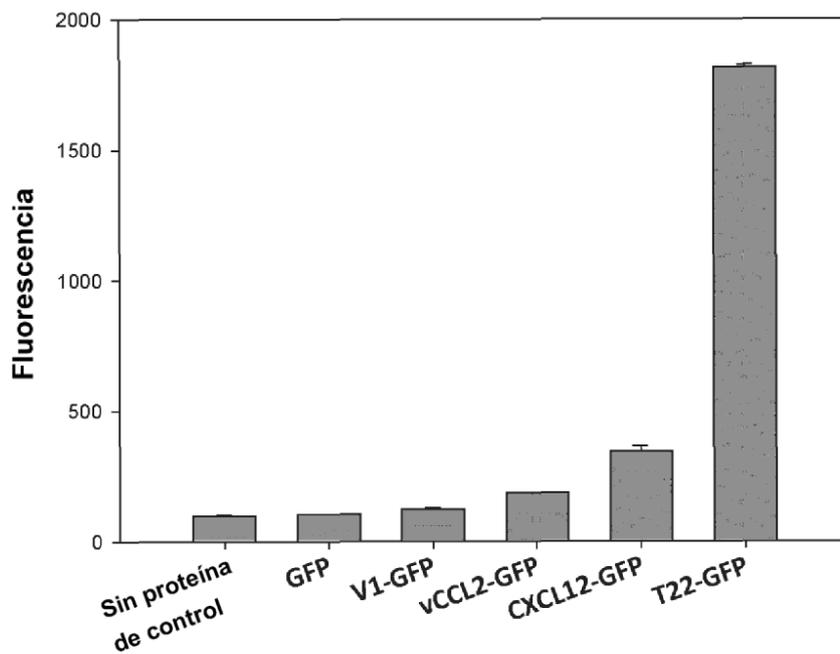


FIG. 1B

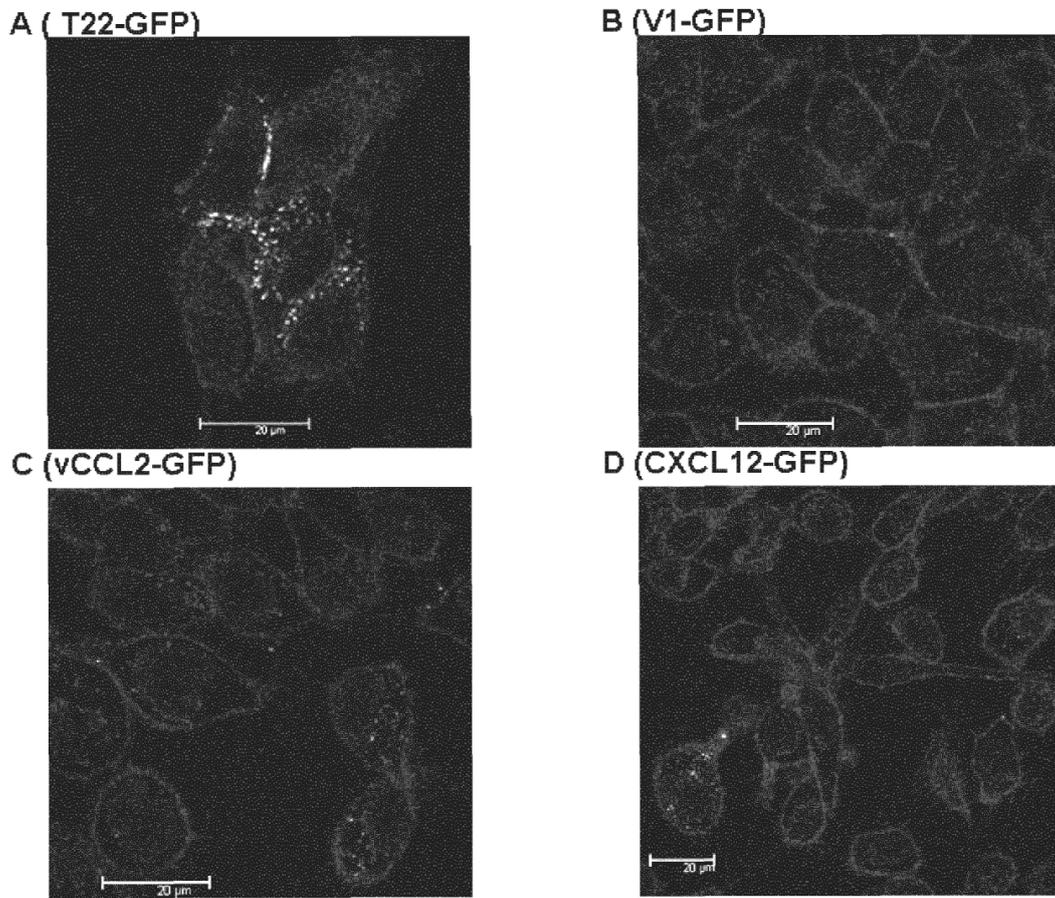


FIG. 2

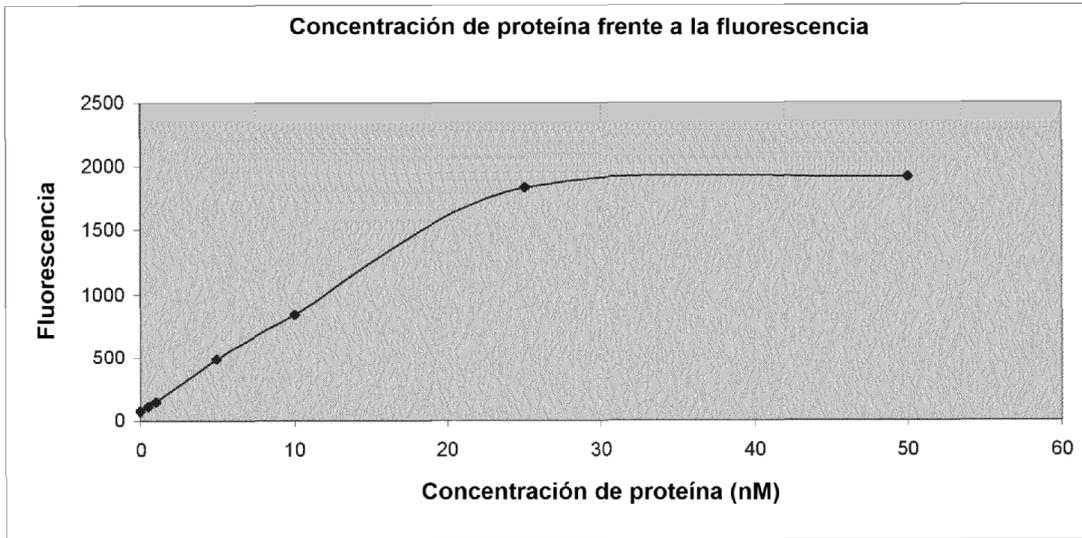


FIG. 3A

Tratamientos con tripsina

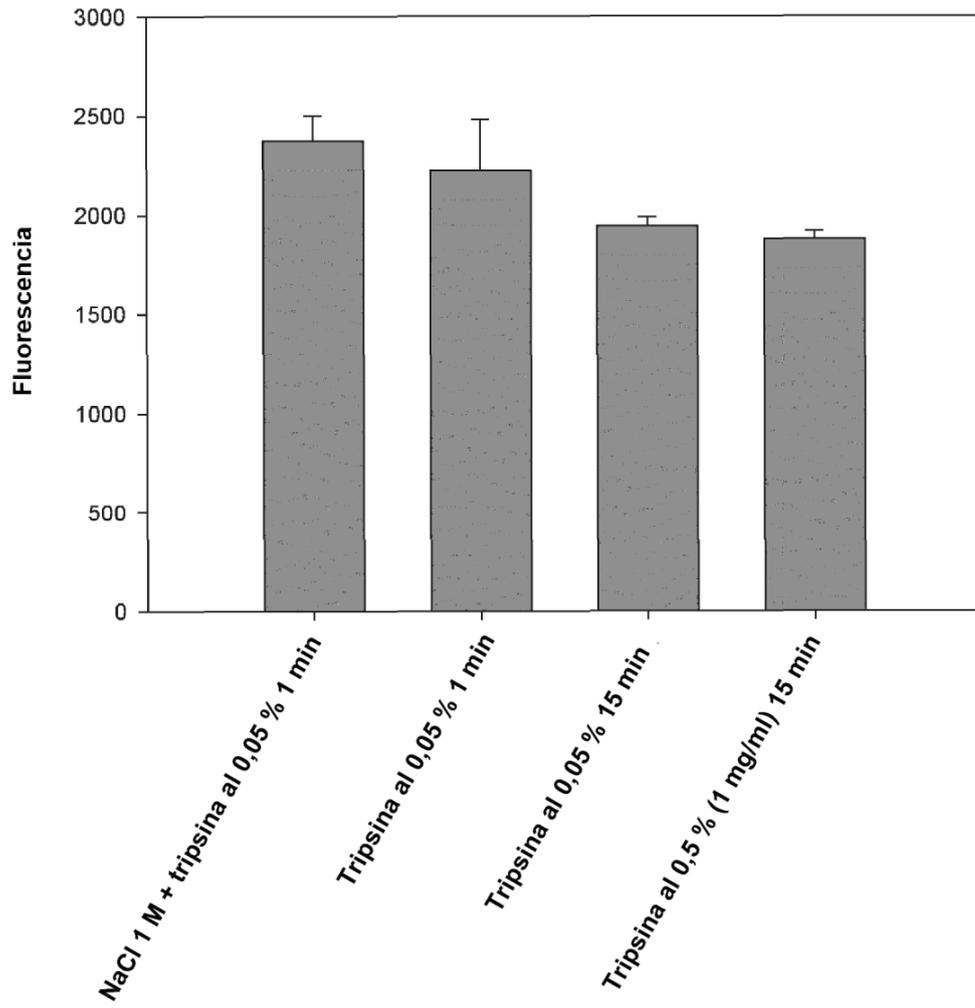
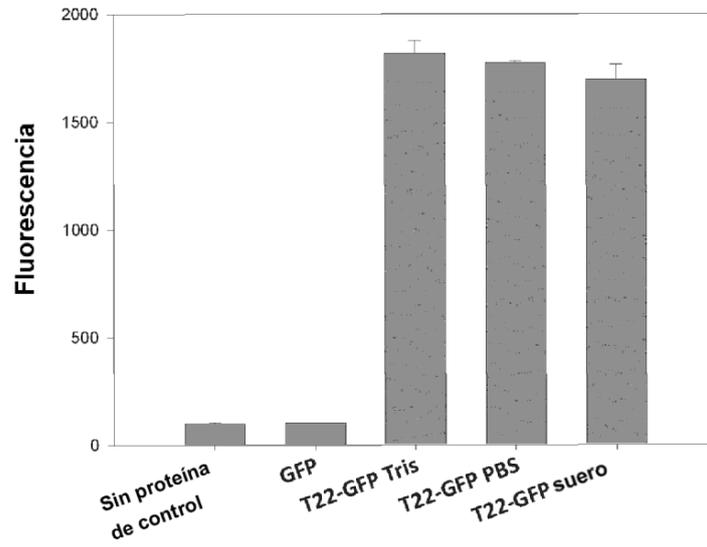


FIG. 3B

**Medio de cultivo T22-GFP Optipro/suero**



**Medio sin suero definido (Optipro):**

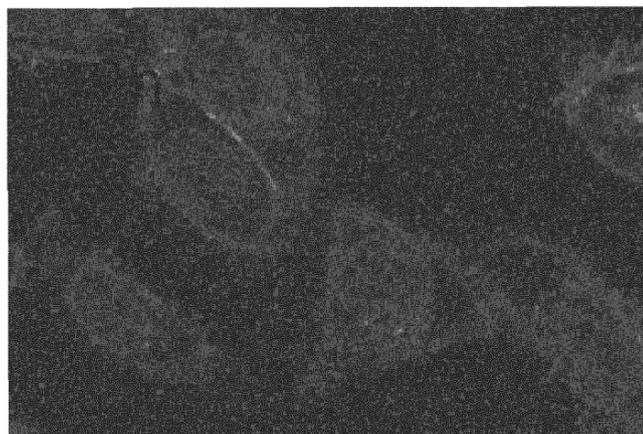
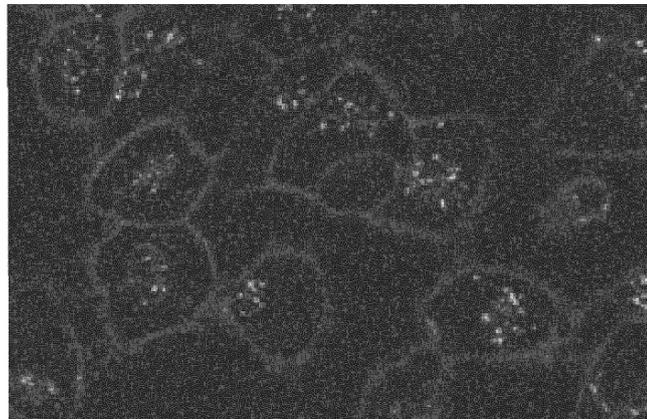


FIG. 3C

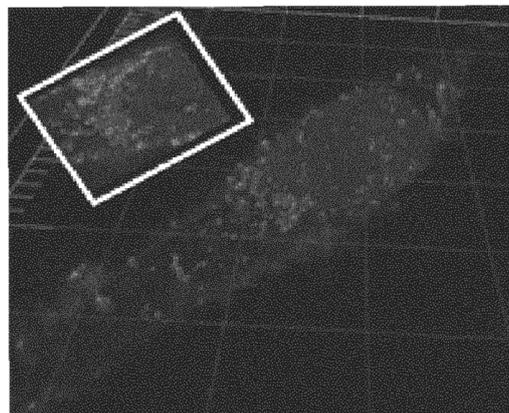
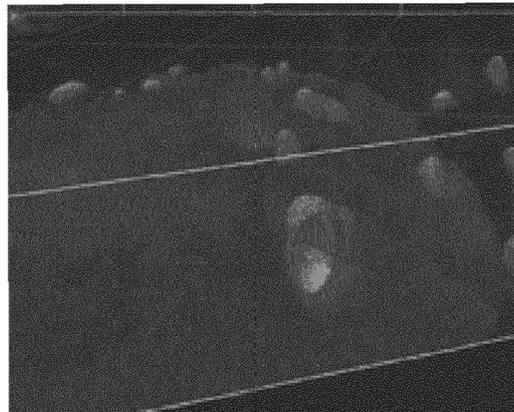
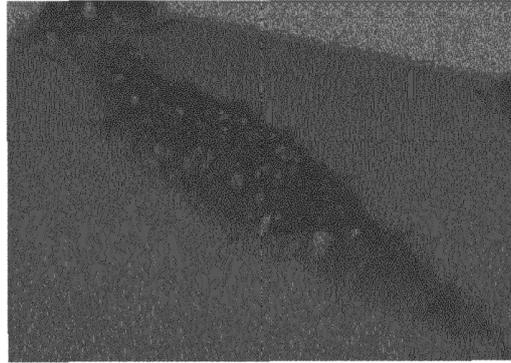


FIG. 3D

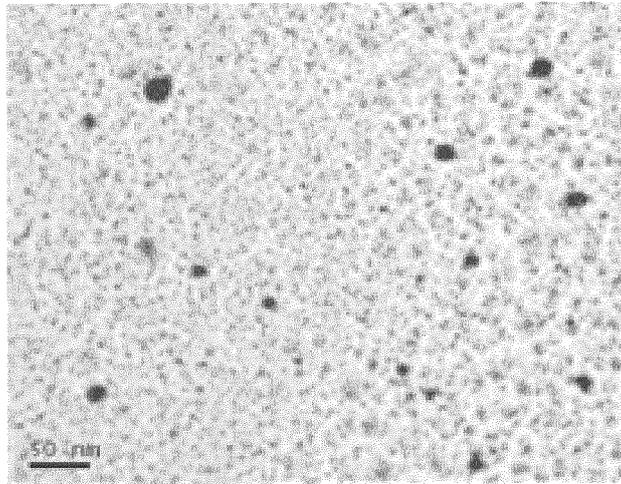


FIG. 3E

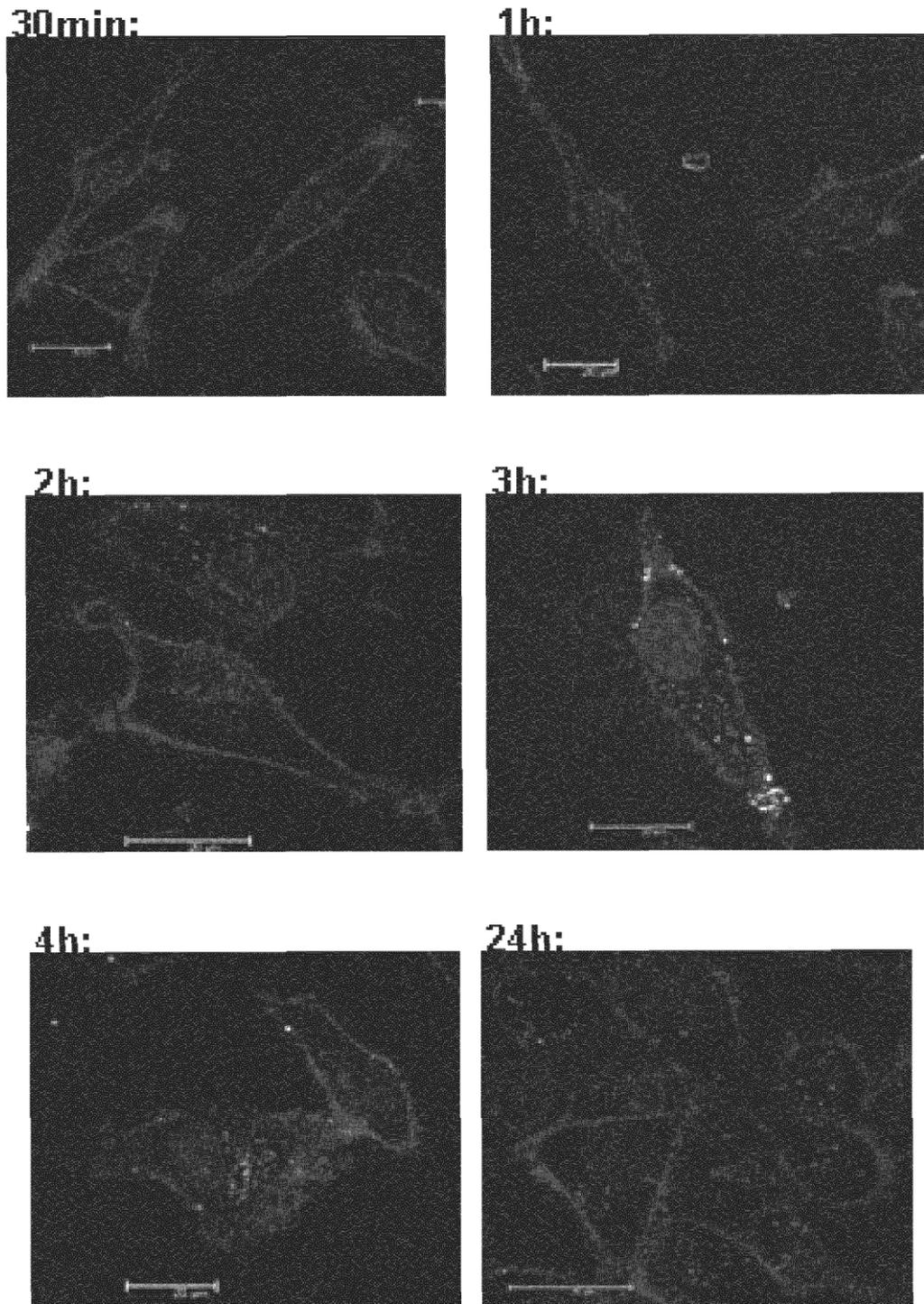


FIG. 3F

**A**

T22-GFP (PBS + glicerol al 10 %) pH=5,91      GFP-His (PBS + glicerol al 10 %) pH=5,91  
PM 1:0 1:0.1 1:0.5 1:1 1:5 1:10 1:20 1:40      PM 1:0 1:0.1 1:0.5 1:1 1:5 1:10 1:20 1:40

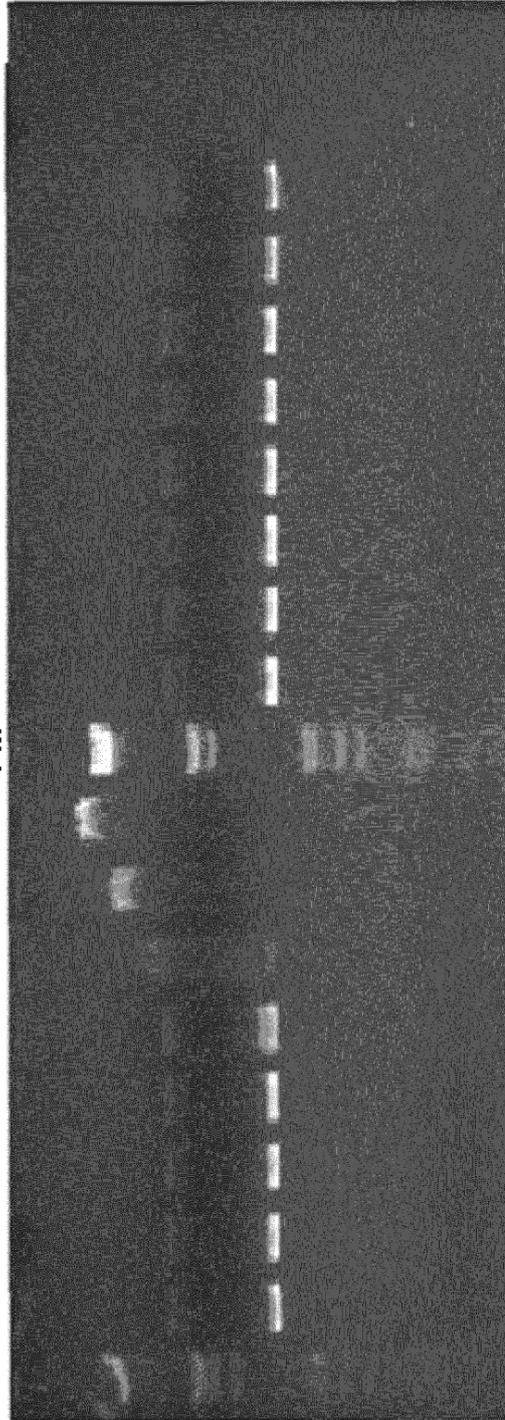


FIG. 4A

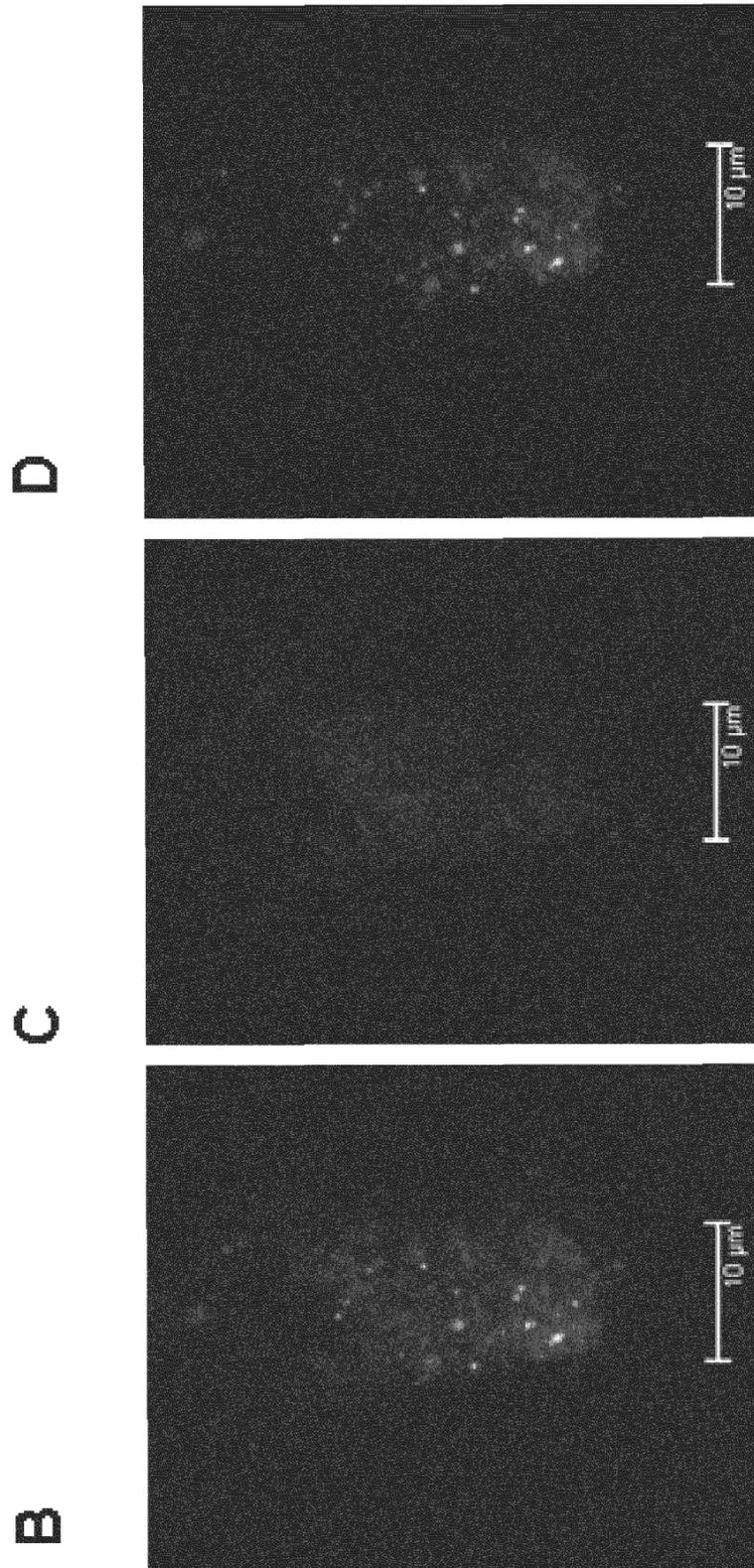


FIG. 4B, 4C y 4D

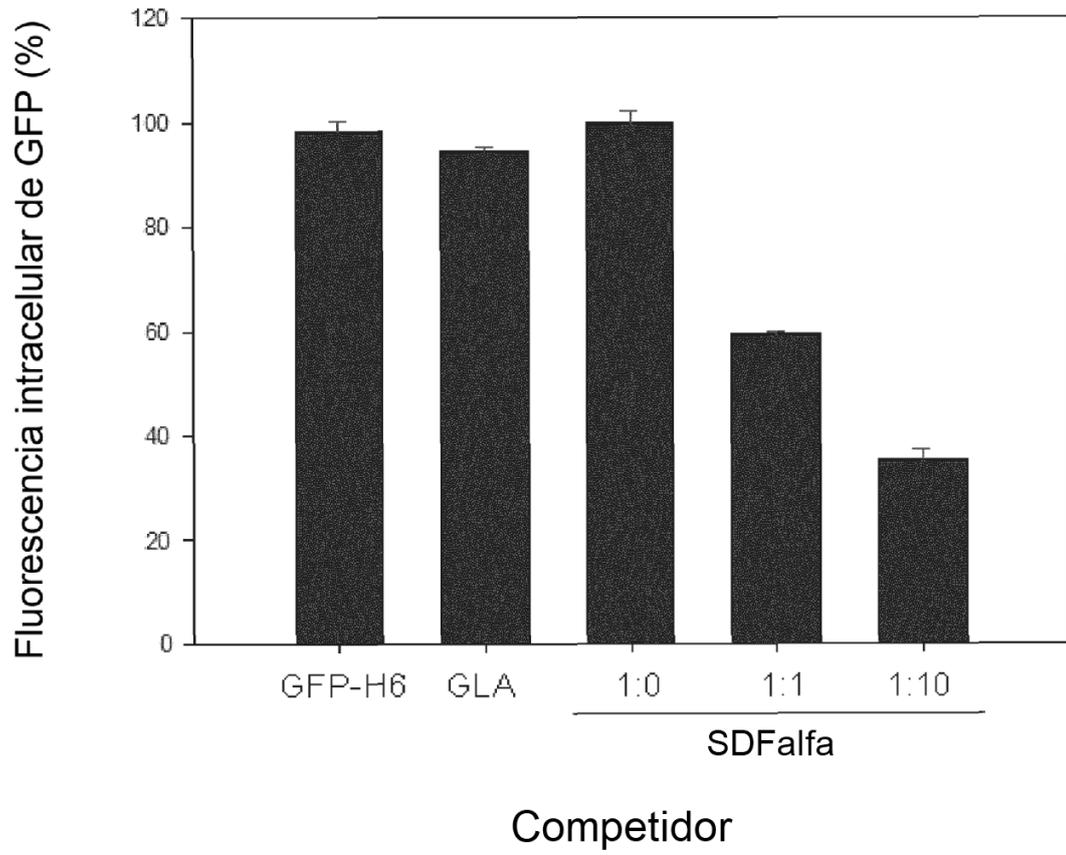


FIG. 5

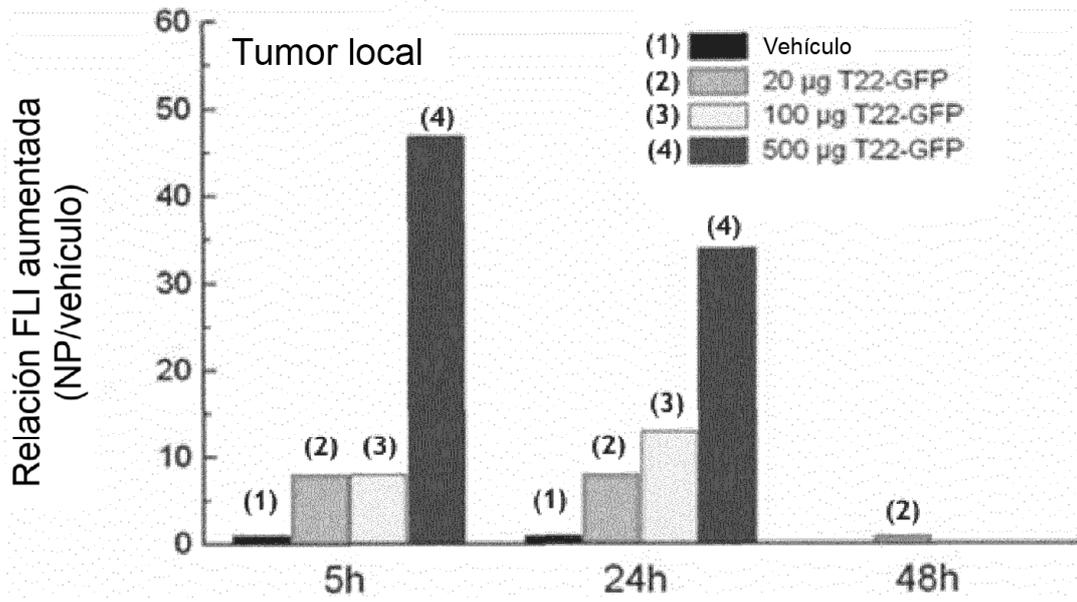


FIG. 6

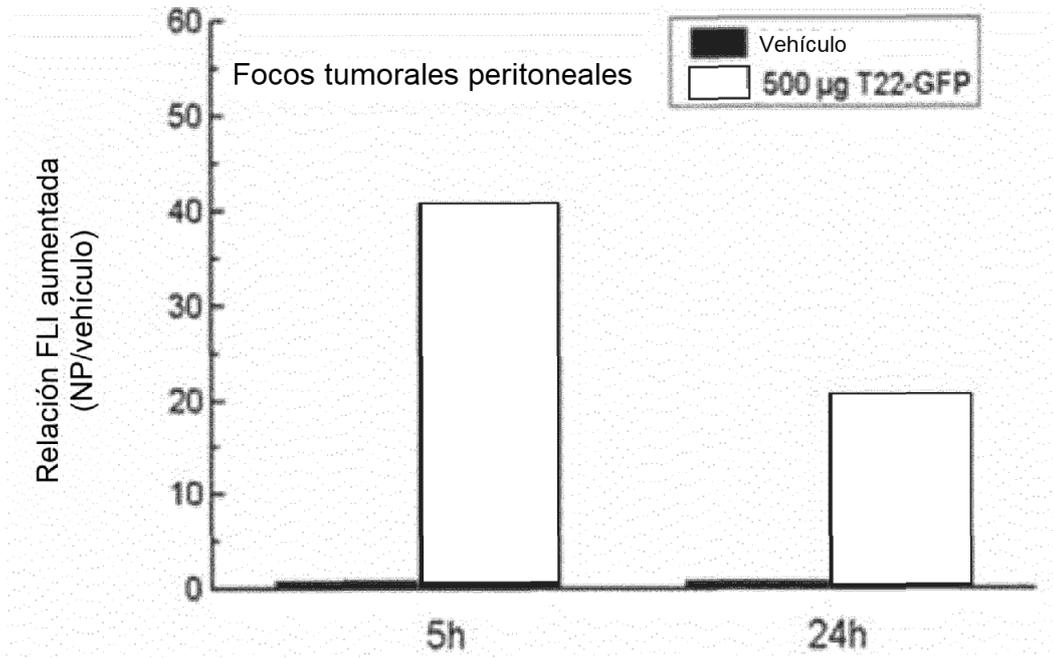


FIG. 7