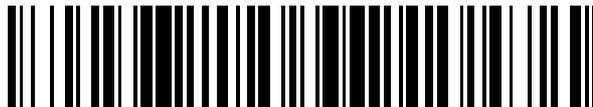


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 943**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/554 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)
C07K 14/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2011 PCT/US2011/001602**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO12036746**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2011 E 11825567 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2616045**

54 Título: **Sistema y métodos de suministro de agentes bioactivos usando secuencias de transporte derivadas de toxina bacteriana**

30 Prioridad:

15.09.2010 US 403394 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2018

73 Titular/es:

**MRSNY, RANDALL J. (50.0%)
 11620 Buena Vista Drive
 Los Altos Hills, CA 94022, US y
 MAHMOOD, TAHIR (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MRSNY, RANDALL J. y
 MAHMOOD, TAHIR**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 656 943 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

Sistema y métodos de suministro de agentes bioactivos usando secuencias de transporte derivadas de toxina bacteriana

5

Solicitudes de patentes relacionadas**Campo técnico**

- 10 El campo de la presente invención se refiere, en parte, a una estrategia para novedosas aplicaciones farmacéuticas. Más específicamente, la presente invención se refiere a un mutante no tóxico del gen Cholix de *Vibrio cholera* (ntCholix), una variante de Cholix truncada en el aminoácido A³⁸⁶ (Cholix³⁸⁶) y el uso de otras secuencias polipeptídicas derivadas de Cholix para potenciar el suministro intestinal de agentes terapéuticos biológicamente activos. De forma importante, los sistemas y métodos descritos en la presente memoria proporcionan lo siguiente: la capacidad de suministrar dosis de macromoléculas sin inyecciones; la capacidad de suministrar una carga, tal como (aunque sin limitación) ARNip o moléculas antisentido en compartimentos intracelulares donde se requiere su actividad; y el suministro de nanopartículas y vehículos basados en dendrímero a través de membranas biológicas, que de lo contrario habría estado impedido debido a las propiedades de barrera de la mayoría de dichas membranas.

20

Antecedentes técnicos

- La mayoría de los fármacos de molécula pequeña actualmente aprobados se absorben a través de mucosa del intestino delgado para proporcionar suministro a la circulación sistémica. De hecho, los fármacos de molécula pequeña se seleccionan basándose en su estabilidad y absorción eficaz a través de las mucosas intestinales. Un suministro oral similar de polipéptidos biológicamente activos (que se refieren a un polímero compuesto de restos de aminoácido; típicamente definidos como una proteína o péptido) ha sido un objetivo establecido desde hace tiempo de la industria farmacéutica. Como el tubo gastrointestinal (GI) está diseñado para digerir proteínas y péptidos de la dieta, existen numerosas barreras físicas, fisiológicas y biológicas que limitan la factibilidad de la captación de proteínas y péptidos terapéuticos desde el intestino de una manera similar a la que se consigue con moléculas pequeñas; Mahato, R.I., *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 20(2-3): pág. 153-214 (2003).

- Se han identificado varias tecnologías que pueden usarse para proteger las proteínas y péptidos terapéuticos a través del estómago, permitiéndoles alcanzar la superficie de absorción de las células epiteliales en el intestino delgado y separándolos de los entornos gástrico e intestinal que funcionan destruyendo las proteínas y péptidos de la dieta. Desafortunadamente, sin embargo, el transporte eficaz a través de esta monocapa simple de células sigue siendo una barrera sustancial debido al tráfico intracelular a los compartimentos lisosómicos destructivos después de la captación endosómica de los polipéptidos en la superficie luminal; Woodley, J.F., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 11(2-3): pág. 61-95 (1994). De hecho, esta barrera está diseñada para inhibir la captación de proteínas y péptidos hasta que estas macromoléculas puedan degradarse suficientemente para su absorción a través de transportadores de aminoácidos y di o tripéptidos. A este respecto, se han examinado varios esfuerzos para superar las barreras físicas, fisiológicas y biológicas de las mucosas intestinales.

- Existen dos rutas básicas a través del epitelio simple que constituye la barrera celular de las mucosas intestinales. Específicamente, una vez a través de la capa mucosa de cobertura, una molécula puede moverse entre células epiteliales adyacentes (ruta paracelular) o moverse a través de las células (ruta transcelular) mediante una serie de vesículas que trafican dentro con, aunque no mezclan, los contenidos con el citoplasma; T. Jung *et al.*, Eur J Pharm Biopharm, 50: 147-160 (2000). En otras palabras, en ambas rutas, un agente terapéutico proteico o peptídico de transporte no entra en la célula, sino que en su lugar permanece en un entorno externo al citoplasma de la célula.

50

- La barrera principal para el movimiento casual de la proteína terapéutica y el movimiento del péptido a través de la ruta paracelular es un complejo de proteínas en el cuello apical de estas células, conocido como unión ocluyente (TJ). Aunque la abertura y cierre transitorio de las estructuras TJ puede facilitar el transporte de péptidos a través de los epitelios intestinales, esta estrategia tiene limitaciones clave: por ejemplo, no funciona bien para moléculas por encima de ~ 5 kDa; tiene el potencial de entrada no selectiva de materiales en el organismo desde el lumen intestinal; y representa una ruta que implica únicamente una pequeña fracción del área superficial del epitelio intestinal.

- La barrera principal para la migración casual de agentes terapéuticos proteicos o peptídicos a través de las células mediante la ruta transcelular es un tráfico de vesículas por defecto que suministra los contenidos de estas vesículas a una ruta destructiva (lisosómica). En comparación con la ruta paracelular, el movimiento a través de la ruta transcelular vesicular puede acomodar materiales tan grandes como de 100 nm de diámetro, implica esencialmente la superficie de las células epiteliales completas, y puede ser muy selectivo en la captación de materiales a través del uso de interacciones de receptor-ligando para la entrada de vesículas. Por tanto, la ruta transcelular es muy atractiva para el transporte epitelial de agente terapéuticos proteicos o peptídicos si puede evitarse la ruta

65

destructiva.

Algunos patógenos han resuelto el problema de la barrera de tráfico, como se demuestra por la eficaz transcitosis de factores de virulencia polipeptídicos secretados que funcionan facilitando y/o estabilizando la infección de un
 5 hospedador. Las exotoxinas representan una clase de proteínas liberadas por una diversidad de microorganismos que funcionan como potentes factores de virulencia. Las exotoxinas funcionan sobre organismos multicelulares con la capacidad de actuar como toxinas potentes en los seres humanos; Roszak, D.B., y Colwell, R.R., *Microbiol Rev* 51: 365-379 (1987). Estas proteínas habitualmente eliminan o inactivan las células hospedadoras a través de mecanismos que implican la alteración selectiva de la síntesis de proteínas. Por consiguiente, únicamente se
 10 requieren unas pocas moléculas para la eliminación, lo que es coherente con la observación de que las exotoxinas bacterianas son algunos de los agentes más tóxicos conocidos. Un subconjunto de estas proteínas compuesto de la familia de proteínas que consiste en toxina diftérica (DT) de *Corynebacterium diphtheria*, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) y una proteína recientemente identificada llamada Cholix de *Vibrio cholera* funcionan intoxicando las células hospedadoras mediante la ADP ribosilación del factor 2 de elongación (EF2); Yates, S.P., *et al.*, *Trends Biochem Sci*, 31: 123-133 (2006). Estas exotoxinas se sintetizan como una única cadena de aminoácidos que se pliega en distintos dominios que se ha identificado que tienen funciones específicas en el abordaje, entrada e
 15 intoxicación de las células hospedadoras.

La biología de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) se ha descrito recientemente; Mrsny, R.J., *et al.*,
 20 *Drug Discov Today*, 7(4): pág. 247-58 (2002). PE está compuesta de una única cadena de 613 aminoácidos que tiene un peso molecular teórico (PM) de 66828,11 Da, un punto isoeléctrico (pI) de 5,28 y que se pliega funcionalmente en tres dominios concretos, indicados dominio I (Ala¹-Glu²⁵²), dominio II (Gly²⁵³-Asn³⁶⁴), dominio III (Gly⁴⁰⁵-Lys⁶¹³), y que contiene un sitio de actividad ADP ribosiltransferasa y un corto bucle unido por disulfuro que une los dominios II y III que se conoce como el bucle Ib (Ala³⁶⁵-Gly⁴⁰⁴). La organización de estos dominios a pH 8,0
 25 se ha determinado a partir de la difracción cristalina a una resolución de ~ 1,5 Å; Wedekind, J.E. *et al.*, *J Mol Biol*, 314: 823-837 (2001). El dominio I (Ia + Ib) tiene un núcleo formado de un enrollamiento β de 13 hebras, el dominio II está compuesto de seis hélices α y el dominio III tiene una compleja estructura de plegamiento α/β. Los estudios han sostenido la idea de que la naturaleza modular de PE permite distintas funciones de los dominios: el dominio I se une a los receptores de la célula hospedadora, el dominio II está implicado en la translocación a través de la
 30 membrana y el dominio III funciona como una ADP ribosiltransferasa. Parece que PE se secreta por *P. aeruginosa* en cercana proximidad a la superficie apical de las células epiteliales, posiblemente en respuesta a indicaciones ambientales y/o señales celulares; Deng, Q. y J.T. Barbieri, *Annu Rev Microbiol*, 62: pág. 271-88 (2008). Una vez secretada, la internalización en las células se produce después de que el dominio I de PE se una a la proteína de membrana α2-macroglobulina, una proteína que también se conoce como la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) o CD91; véase, por ejemplo, FitzGerald, D.J., *et al.*, *J Cell Biol*, 129(6): pág. 1533-41 (1995); Kounnas, M.Z., *et al.*, *JBiol Chem*, 267(18): pág. 12420-3 (1992). Después de la internalización, PE evita el tráfico al lisosoma y en su lugar se suministra de forma eficaz a la superficie basolateral de la célula donde se libera en una forma biológicamente activa; Mrsny, R.J., *et al.*, *Drug Discov Today*, 7(4): pág. 247-58 (2002). Una vez a través del epitelio, PE funciona como un factor de virulencia entrando en células CD91 positivas dentro del
 40 espacio submucoso (macrófagos y células dendríticas) donde se cruza con una ruta de desplegamiento que da lugar al suministro citoplasmático del dominio III; véase, por ejemplo, Mattoo, S., Y.M. Lee y J.E. Dixon, *Curr Opin Immunol*, 19(4): pág. 392-401 (2007); Spooner, R.A., *et al.*, *Virology*, 3: pág. 26 (2006).

La bacteria *Vibrio cholerae* es muy conocida por su agente de virulencia epónimo, la toxina colérica (CT), que puede
 45 causar diarrea acuosa masiva potencialmente mortal, aguda. La CT es un complejo proteico compuesto de una única subunidad A organizada con un pentámero de subunidades B que se une a las estructuras de gangliósido G_{M1} de la superficie celular en la superficie apical de los epitelios. La CT se secreta por *V. cholera* después de la transferencia horizontal de genes con cepas virulentas de *V. cholerae* que portan una variante del bacteriófago lisogénico llamado CTXf o CTXφ. Los recientes brotes de cólera, sin embargo, han sugerido que las cepas de
 50 algunos serogrupos (no O1, no O139) no expresan CT, sino que en su lugar usan otros factores de virulencia. Los análisis detallados de los datos ambientales y clínicos no O1, no O139 sugirieron la presencia de una novedosa exotoxina secretada putativa con alguna similitud con PE.

Jorgensen, R. *et al.*, *JBiol Chem*, 283(16): 10671-10678 (2008) informó de que algunas cepas *V. cholerae* no
 55 contenían, de hecho, una toxina proteica que tiene similitud con PE y que llamaron toxina Cholix (Cholix). En comparación con PE, Cholix tiene un PM teórico ligeramente mayor (70703,89 Da) y un pI teórico, ligeramente más ácido (5,12). La estructura cristalina de la proteína Cholix de 634 aminoácidos se ha resuelto a ~ 2 Å. Se descubrió que la estructura de dominios y organización era algo similar a PE: dominio I (Val¹-Lys²⁶⁵), dominio II (Glu²⁶⁶-Ala³⁸⁶), dominio III (Arg⁴²⁶-Lys⁶³⁴) y un bucle Ib (Ala³⁸⁷-Asn⁴²⁵). La similitud estructural adicional con PE incluye: un sitio de
 60 proteasa furina para la activación celular; una secuencia KDEL C-terminal que puede guiar a la toxina al retículo endoplasmático de la célula hospedadora; y un sitio de actividad ADP ribosiltransferasa dentro del dominio III.

De forma notable, PE y Cholix comparten similitud genética no significativa y limitada por alineación de aminoácidos. La búsqueda en el genoma de *V. cholera* de secuencias de nucleótidos de tipo PE no logra producir coincidencias
 65 de ningún tipo. Únicamente a nivel de secuencia proteica hay indicios de que una proteína de tipo PE pudiera

producirse por esta bacteria. Incluso en esta ocasión, hay únicamente un 32 % de homología entre las secuencias de aminoácidos de PE y Cholix con similitudes (42 % de homología) centradas en los elementos de ADP ribosilación del dominio III, y con bajos niveles de homología de aminoácidos (~ 15-25 %) para la mayoría de los segmentos de los dominios I y II para las dos proteínas. Además, esa disposición global de Cholix respecto a PE es incluso más llamativa ya que estas dos proteínas con elementos similares se obtuvieron de dos direcciones distintas: *P. aeruginosa* es una bacteria rica en GC mientras que *V. cholera* es rica en AT. Que estas dos toxinas evolucionaran a partir de dos direcciones genéticas diferentes para llegar a casi la misma estructura, pero con únicamente un 32 % de homología de aminoácidos sugiere que las similitudes estructurales y funcionales de Cholix y PE probablemente se basan en presiones similares de supervivencia en lugar de a través de fondos genéticos similares. La muy baja homología de aminoácidos de los dominios I y II para estas dos proteínas enfatiza la importancia funcional de las estructuras plegadas de estas dos proteínas y no de sus secuencias de aminoácidos.

La parte C-terminal de Cholix y PE parecen funcionar en la intoxicación de las células a través de la ADP ribosilación de EF2 en rutas comparables. Los estudios recientes en los que la última mitad de Cholix (dominio I eliminado) estaba dirigida a células cancerosas a través de la conjugación con un anticuerpo dirigido al receptor de transferrina sugiere que la partes C-terminales de PR y Cholix implicadas en la ADP ribosilación de EF2 eran, de hecho, funcionalmente similares; Sarnovsky, R., *et al.*, Cancer Immunol Immunother 59: 737-746 (2010). Aunque esta parte distal de Cholix es un 36 % idéntica y un 50 % similar a PE, los antisueros policlonales generados en animales, así como los sueros de pacientes que tienen respuestas inmunitarias neutralizantes contra la misma parte distal de PE no lograron reaccionar de forma cruzada con esta última parte de Cholix. Asimismo, los antisueros generados contra Cholix no lograron reaccionar de forma cruzada con PE. Estos datos sugieren que, aunque tanto PE como Cholix comparten una capacidad de intoxicar las células a través de un mecanismo similar y que estas dos proteínas comparten una estructura central común, hay diferencias llamativas en sus elementos que se expresan en la superficie de estas proteínas.

Como los estudios previos usando PE han demostrado que esta toxina se transporta fácilmente a través de monocapas polarizadas de células epiteliales *in vitro* e *in vivo* sin intoxicación; Mrsny, R.J., *et al.*, Drug Discov Today, 7(4): pág. 247-58 (2002), los autores de la presente invención han comenzado una investigación para evaluar adicionalmente las propiedades y biología de Cholix, centrados particularmente en los aspectos funcionales de las partes proximales de Cholix; específicamente, el uso de los dominios I y II para facilitar el transporte a través de las monocapas epiteliales intestinales. Como los dominios I y II parecen ser los únicos elementos esenciales de PE necesarios para la transcitosis epitelial, fue particularmente importante examinar estos mismos dominios en Cholix. Como se indica previamente, hay únicamente ~ 15 % ~ 25 % de homología de aminoácidos sobre la mayoría de las regiones que se considerarían parte de los dominios I y II. Los autores de la presente invención examinaron los dominios a través de una serie de estudios: el control de la distribución biológica de Cholix después de aplicación a superficies epiteliales *in vivo*, la evaluación de las características de transporte transcelular de Cholix a través de monocapas de células epiteliales polarizadas *in vitro* y el suministro de una carga biológicamente activa integrada genéticamente en la proteína Cholix en su extremo C. Los datos preliminares generados por la fusión genética de los dos primeros dominios de Cholix (aminoácidos 1-386) a la proteína fluorescente verde (GFP) o el acoplamiento químico de estos dominios expresados a microesferas de látex de 100 nm de diámetro demostraron que se observaba que Cholix unida a microesferas de látex de 100 nm se transportaba a través de las monocapas epiteliales intestinales *in vitro* e *in vivo*. Que la carga de GFP retuviera su carácter fluorescente durante y después del proceso de transcitosis también apoya la controversia de que Cholix utiliza una ruta de tráfico no destructiva (o privilegiada) a través de las células epiteliales polarizadas. Este resultado es un buen augurio para su aplicación (repetida) como herramienta para suministrar cargas biológicamente activas a través de barreras epiteliales del organismo, tales como las del aparato respiratorio y gastrointestinal.

También es importante de los estudios preliminares la observación que sugiere una diferencia de interacción aparente de los receptores celulares entre PE y Cholix. Como se indica previamente, PE entra en las células epiteliales después de que el dominio I de PE se una a la proteína de membrana α 2-macroglobulina, una proteína que también se conoce como proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) o CD91. Aunque la identidad exacta del receptor superficial para Cholix no se ha establecido, los estudios preliminares sugieren que Cholix no intoxica algunas líneas celulares que expresan CD91, sino que intoxica algunas líneas celulares que no expresan CD91. Actualmente no está claro que otros receptores, además de CD91, podrían estar implicados en la transcitosis epitelial de PE. No obstante, Cholix y PE parecen tener distintas interacciones de receptor celular, lo que demuestra las claras diferencias que son suficientes para sugerir aplicaciones muy diferentes e imprevistas para ambos agentes biológicos orales y el suministro intracelular de agentes bioactivos.

Divulgación de la invención

La presente invención se basa en las propiedades de tráfico de Cholix a través de la membrana y la demostración de que Cholix se transporta de forma eficaz a través de células epiteliales polarizadas de las vías respiratorias y el intestino, lo que sugiere que se secuencias polipeptídicas derivadas de Cholix (incluyendo los elementos proximales de la proteína) pueden usarse para la transcitosis eficaz de la proteína y nanopartículas, lo que representa una estrategia para novedosas aplicaciones farmacéuticas. *: como se define en las reivindicaciones.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar construcciones de suministro aisladas * (por ejemplo, fusiones genéticas o construcciones químicas) que comprenden un dominio transportador (por ejemplo, una secuencia polipeptídica derivada de Cholix) y una carga. Tanto el dominio de transporte como la carga pueden expresarse/unirse en relaciones estequiométricas y organización espacial variables. Las diferentes cargas también pueden expresarse/unirse en la misma construcción. En realizaciones preferidas, dicha carga puede incluir uno o cualquiera de: proteínas, péptidos, moléculas pequeñas, ARNip, PNA, miARN, ADN, plásmido y antisentido.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar la capacidad de suministrar una carga tal como macromoléculas, sin inyecciones.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar la capacidad de suministrar una carga, tal como (aunque sin limitación) macromoléculas, moléculas pequeñas, ARNip, PNA, miARN, ADN, plásmido y moléculas antisentido, en compartimentos intracelulares donde se requiere su actividad.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar el transporte de una carga mediante el suministro de nanopartículas y/o vehículos basados en dendrímero a través de membranas biológicas.

Los métodos de administración/suministro contemplados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, administración oral, administración pulmonar, administración intranasal, administración bucal, administración sublingual, administración ocular (incluyendo, aunque sin limitación, suministro al cuerpo vítreo, córnea, conjuntiva, esclerótica y los compartimentos posterior y anterior del ojo), aplicación tópica, inyección (con aguja o sin aguja), infusión intravenosa, aplicación con microaguja, administración mediante una formulación de depósito de fármaco, administración mediante aplicación intratecal, administración mediante aplicación intraperitoneal, administración mediante aplicación intraarticular, suministro intracelular, suministro a través de la barrera hematoencefálica, suministro a través de la barrera hematorretiniana, administración para suministro y acción local y/o suministro para suministro sistémico.

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende las construcciones de suministro y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una visión general de la estrategia usada para la modificación C-terminal de ntCholix para facilitar la fusión con una carga, en este caso, siendo la carga el colorante fluorescente Alexa488.

La figura 2 representa el transporte de ntCholix-Alexa488® a través de células epiteliales intestinales polarizadas *in vitro*. Se expusieron monocapas de células Caco-2 a materiales de ensayo durante 4 horas. El porcentaje de material transportado se determinó por análisis de la curva patrón de la fluorescencia presente en las muestras y se presentó como un promedio (N = 4). Se usó BSA-Alexa488 como un control.

Modo o modos para realizar la invención

Como apreciarán los expertos en la técnica, la descripción anterior describe ciertas realizaciones preferidas de la invención en detalle y, por tanto, es únicamente representativa y no representa el alcance real de la invención. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es con el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado habitualmente comprendido por los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados adjudicados a ellos salvo que se especifique de otro modo.

Los estudios subyacentes de la presente invención se refieren al uso de secuencias polipeptídicas derivadas de Cholix como el dominio transportador a usar para preparar construcciones de suministro aisladas para potenciar el suministro intestinal de agentes terapéuticos biológicamente activos. De forma importante, los sistemas y métodos descritos en la presente memoria proporcionan lo siguiente: la capacidad de suministrar dosis de macromoléculas sin inyecciones; la capacidad de suministrar una "carga" en compartimentos intracelulares donde se requiere su actividad; y el suministro de nanopartículas y/o vehículos basados en dendrímero a través de membranas biológicas, que de lo contrario habría estado impedido debido a las propiedades de barrera de la mayoría de dichas membranas.

La toxina Cholix madura ("Cholix") es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 70 kDa) secretada por *Vibrio cholerae*, y que está compuesta de tres dominios globulares prominentes (Ia, II y III) y un subdominio pequeño (Ib) que conecta los dominios I y III. La secuencia de aminoácidos de Cholix madura se

proporciona en Jorgensen, R. *et al.*, J Biol Chem, 283(16): 10671-10678 (2008) y referencias citadas en el mismo. Las secuencias polipeptídicas derivadas de Cholix usadas en la preparación de las construcciones de suministro aisladas de la presente invención se obtendrán de la secuencia proteica de 634 aminoácidos presentada de Cholix madura.

5

Por consiguiente, las construcciones de suministro de la presente invención comprenden un dominio transportador. Un "dominio transportador" como se usa en la presente memoria se refiere a dominios estructurales que son capaces de realizar ciertas funciones, por ejemplo, reconocimiento celular (es decir, comprende un dominio de unión al receptor) y transcitosis (es decir, comprende un dominio de transcitosis). Globalmente, los dominios transportadores a usarse en la preparación de las construcciones de suministro de la presente invención son secuencias polipeptídicas derivadas de Cholix que tienen dominios estructurales correspondientes a los dominios funcionales, por ejemplo, la y II de Cholix.

Además de las partes de la molécula que corresponden a dominios funcionales de Cholix, las construcciones de suministro de la invención comprenden además una macromolécula para su suministro a un compartimento biológico de un sujeto. En ciertas realizaciones, la macromolécula se selecciona del grupo de un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, una proteína, un polisacárido y un lípido. En realizaciones adicionales, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en hormonas polipeptídicas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y factores de coagulación que se administran habitualmente a los sujetos por inyección. Las secuencias de todas estas macromoléculas son bien conocidas para los expertos en la materia y la unión de estas macromoléculas a las construcciones de suministro pertenece a las habilidades de los expertos en la materia usando técnicas convencionales.

La macromolécula puede introducirse en cualquier parte de la construcción de suministro que no altere una actividad de unión celular o transcitosis. La macromolécula se conecta al resto de la construcción de suministro a través de un conector escindible. "Conector" se refiere a una molécula que une dos moléculas diferentes, de forma covalente o a través de enlaces iónicos, de van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que hibrida con una secuencia complementaria en el extremo 5' y con otra secuencia complementaria en el extremo 3', uniendo de ese modo dos secuencias no complementarias. Un "conector escindible" se refiere a un conector que puede degradarse o escindirse de otra manera para separar los dos componentes conectados por el conector escindible. Los conectores escindibles se escinden globalmente por enzimas, típicamente peptidasas, proteasas, nucleasas, lipasas y similares. Los conectores escindibles también pueden escindirse por indicios ambientales tales como, por ejemplo, cambios en la temperatura, pH, concentración salina, etc. cuando existe dicho cambio en el entorno después de la transcitosis de la construcción de suministro a través de una membrana epitelial polarizada.

35

Las construcciones de suministro pueden comprender además una segunda macromolécula que se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, una proteína, un lípido y una molécula orgánica pequeña y un segundo conector escindible, en el cual la escisión en dicho segundo conector escindible separa dicha segunda macromolécula del resto de dicha construcción. La primera macromolécula puede ser un primer polipéptido y dicha segunda macromolécula puede ser un segundo polipéptido. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden asociarse para formar un multímero. El multímero puede ser un dímero, tetrámero u octámero. El dímero puede ser un anticuerpo.

La macromolécula puede seleccionarse para que no sea escindible por una enzima presente en la membrana basolateral de una célula epitelial. Por ejemplo, los ensayos descritos en los ejemplos pueden usarse para ensayar de forma rutinaria si dicha enzima de escisión puede escindir la macromolécula a suministrar. Si lo hace, la macromolécula puede alterarse de forma rutinaria para eliminar la secuencia de aminoácidos ilícita reconocida por la enzima de escisión. La macromolécula alterada entonces puede ensayarse para asegurar que retiene la actividad usando métodos rutinarios en la técnica.

50

El primero y/o el segundo conector escindible puede ser escindible por una enzima que muestra mayor actividad sobre el lado basolateral de una célula epitelial polarizada de lo que lo hace en el lado apical de la célula epitelial polarizada. El primero y/o el segundo conector escindible puede ser escindible por una enzima que muestra mayor actividad en el plasma de lo que lo hace en el lado apical de una célula epitelial polarizada.

55

El conector escindible puede seleccionarse basándose en la secuencia, en el caso de macromoléculas peptídicas, polipeptídicas o proteicas para su suministro, para evitar el uso de conectores escindibles que comprenden secuencias presentes en la macromolécula a suministrar. Por ejemplo, si la macromolécula comprende AAL, el conector escindible puede seleccionarse para que se escinda por una enzima que no reconoce esta secuencia.

60

Además de las partes de la molécula que corresponden a dominios funcionales de Cholix, las construcciones de suministro de esa invención comprenden además una "carga" para su suministro en compartimentos intracelulares donde se requiere su actividad. Una "carga", como se usa en la presente memoria incluye, aunque sin limitación: macromoléculas, moléculas pequeñas, ARNip, PNA, miARN, ADN, plásmido y moléculas antisentido. Otros ejemplos de carga que pueden suministrarse según la presente invención incluyen, aunque sin limitación, compuestos

65

antineoplásicos, tales como nitrosoureas, por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina; metilhidracinas, por ejemplo, procarbacin, dacarbacin; hormonas esteroideas, por ejemplo, glucocorticoides, estrógenos, progestinas, andrógenos, tetrahydrodesoxicaricosterona; compuestos inmunoactivos tales como inmunosupresores, por ejemplo, pirimetamina, trimetopterina, penicilamina, ciclosporina, azatioprina; e
 5 inmunostimulantes, por ejemplo, levamisol, ditiocarbamato de dietilo, encefalinas, endorfinas; compuestos antimicrobianos tales como antibióticos, por ejemplo, betalactama, penicilina, cefalosporinas, carbapenems y monobactamas, inhibidores de betalactamasa, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, espectinomina; antipalúdicos, amebicidas; antiprotozoicos; difúngicos, por ejemplo, anfotericina beta; antiviricos, por ejemplo, aciclovir, idoxuridina, ribavirina, trifluridina, vidarbina, ganciclovir; parasiticidas; antihelmínticos; agentes
 10 radiofarmacéuticos; fármacos gastrointestinales; compuestos hematológicos; inmunoglobulinas; proteínas coagulantes de la sangre, por ejemplo, factor antihemofílico, complejo de factor IX; anticoagulantes, por ejemplo, dicumarol, heparina Na; inhibidores de fibroblastos, por ejemplo, ácido tranexámico; fármacos cardiovasculares; fármacos antiadrenérgicos periféricos; fármacos antihipertensivos de acción central, por ejemplo, metildopa, metildopa HCl; vasodilatadores directos antihipertensivos, por ejemplo, diazóxido, hidralacina HCl; fármacos que
 15 afectan al sistema de renina-angiotensina; vasodilatadores periféricos, por ejemplo, fentolamina; fármacos antianginosos; glucósidos cardíacos; inodilatadores, por ejemplo, amrinona, milrinona, enoximona, fenoximona, imazodán, sulmazol; antiarrítmicos; bloqueantes de la entrada de calcio; fármacos que afectan a los lípidos sanguíneos, por ejemplo, ranitidina, bosentán, rezulina; fármacos respiratorios; fármacos simpaticomiméticos, por ejemplo, albuterol, mesilato de bitolterol, dobutamina HCl, dopamina HCl, efedrina So, epinefrina, fenfluramina HCl,
 20 isoproterenol HCl, metoxamina HCl, bitartrato de norepinefrina, fenilefrina HCl, ritodrina HCl; fármacos parasimpaticomiméticos, por ejemplo, acetilcolina Cl; anticolinesterasas, por ejemplo, edrofonio Cl; reactivadores de colinesterasa; fármacos bloqueantes adrenérgicos, por ejemplo, acebutolol HCl, atenolol, esmolol HCl, labetalol HCl, metoprolol, nadolol, mesilato de fentolamina, propranolol HCl; fármacos antimuscarínicos, por ejemplo, metilbromuro de anisotropina, atropina SO₄, clinidio Br, glucopirrolato, ipratropio Br, escopolamina HBr; fármacos bloqueantes
 25 neuromusculares; fármacos despolarizantes, por ejemplo, besilato de atracurio, hexafluorenio Br, yoduro de metocurina, succinilcolina Cl, tubocurarina Cl, vecuronio Br; relajantes musculares de acción central, por ejemplo, baclofeno; neurotransmisores y agentes neurotransmisores, por ejemplo acetilcolina, adenosina, adenosina trifosfato; neurotransmisores aminoacídicos, por ejemplo, aminoácidos excitadores, GABA, glicina; neurotransmisores de amina biogénica, por ejemplo, dopamina, epinefrina, histamina, norepinefrina, octopamina,
 30 serotonina, tiramina; neuropéptidos, óxido cítrico, toxinas del canal de K⁺; fármacos antiparkinsonianos, por ejemplo, amantidina HCl, mesilato de benztropina, carbidopa; fármacos diuréticos, por ejemplo, diclorfenamida, metazolamida, bendroflumetiácida, politiacida; fármacos antijaquecosos, por ejemplo, mesilato de trometamina carboprost, maleato de metilsergida. Los dominios transportadores de las construcciones de suministro de la presente invención globalmente comprenden un dominio de unión al receptor. El dominio de unión al receptor puede
 35 ser cualquier dominio de unión al receptor conocido para los expertos en la materia sin limitación, para unirse a un receptor de superficie celular que está presente en la membrana apical de una célula epitelial. Preferentemente, el dominio de unión al receptor se une específicamente al receptor de superficie celular. El dominio de unión al receptor debe unirse al receptor de superficie celular con suficiente afinidad para permitir la endocitosis de la construcción de suministro.

40 El dominio de unión al receptor puede comprender un péptido, un polipéptido, una proteína, un lípido, un carbohidrato o una molécula orgánica pequeña, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de cada una de estas moléculas que se unen a receptores de superficie celular presentes en la membrana apical de las células epiteliales son bien conocidos para los expertos en la materia. Los péptidos o polipéptidos adecuados incluyen,
 45 aunque sin limitación, dominios de unión al receptor de toxina bacteriana, tales como los dominios de unión al receptor de PE, toxina colérica, toxina Cholix, toxina botulínica, toxina diftérica, toxina shiga, toxina de tipo shiga, etc.; anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y de una cadena, o derivados de los mismos, factores de crecimiento, tales como EGF, IGF-I, IGF-II, IGFIII etc.; citocinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, etc.; quimiocinas, tales como MIP-1a, MIP-1b, MCAF, IL-8, etc.; y otros ligandos, tales como CD4, moléculas de adhesión
 50 celular de la superfamilia de inmunoglobulina, integrinas, ligandos específicos para el receptor de IgA, etc. Los expertos en la materia pueden seleccionar el dominio de unión al receptor apropiado basándose en el patrón de expresión del receptor al que se une el dominio de unión al receptor.

El dominio de unión al receptor puede unirse al resto de la construcción de suministro por cualquier método o medio
 55 conocido por los expertos en la materia como útil para unir dichas moléculas, sin limitación. El dominio de unión al receptor puede expresarse junto con el resto de la construcción de suministro como una proteína de fusión. Dichas realizaciones, son particularmente útiles cuando el dominio de unión al receptor y el resto de la construcción se forman a partir de péptidos o polipéptidos.

60 Los dominios transportadores de las construcciones de suministro de la presente invención comprenden además un dominio de transcitosis. El dominio de transcitosis puede ser cualquier dominio de transcitosis conocido por los expertos en la materia para lograr la transcitosis de proteínas quiméricas que se han unido a un receptor de superficie celular presente en la membrana apical de una célula epitelial. En realizaciones preferidas, el dominio de transcitosis es el dominio II de Cholix.

65

Sin intención de limitarse a teoría particular alguna o mecanismo de acción, se cree que el dominio de transcitosis permite el tráfico de la construcción de suministro a través de una célula epitelial polarizada después de que la construcción se una a un receptor presente en la superficie apical de la célula epitelial polarizada. Dicho tráfico a través de una célula epitelial polarizada se menciona en la presente memoria como "transcitosis". Este tráfico
5 permite la liberación de la construcción de suministro desde la membrana basolateral de la célula epitelial polarizada.

Para el suministro de la carga destinada para su actividad intracelular, la construcción de suministro comprende un dominio de endocitosis para el tráfico de la carga al interior de la célula, y también puede comprender un conector
10 escindible. Esto incluye el suministro intracelular de la carga usando vehículos de nanopartícula y/o basados en dendrimeros dirigidos al receptor de superficie celular por decoración de la superficie del vehículo con una o más copias del dominio de endocitosis, con o sin el uso de conectores.

Sin la intención de limitarse a teoría particular alguna o mecanismo de acción, se cree que el dominio de endocitosis
15 permite el tráfico de la construcción de suministro al interior de una célula después de que la construcción se haya unido a un receptor presente en la superficie de la célula. Dicho tráfico al interior de una célula se menciona en la presente memoria como "endocitosis". Este tráfico permite la liberación de la construcción de suministro en el compartimento intracelular relevante, incluyendo (aunque sin limitación) el núcleo y la envuelta nuclear, las vesículas ribosómicas, el retículo endoplasmático, las mitocondrias, el aparato de Golgi y el citosol.

Puede evaluarse la identificación de proteasas y peptidasas que operan procesos biológicos que se producen en la superficie basolateral de estas células. Estas proteasas y peptidasas entrarían en varias categorías que pueden
20 definirse por sus sustratos: 1) prohormonas y enzimas que se secretan desde las superficies basolaterales epiteliales y que requieren recorte para su activación, 2) hormonas activas o enzimas cuya actividad se neutraliza por un evento de escisión para regular su actividad y 3) enzimas sistémicas y factores de crecimiento cuyas acciones en la superficie basolateral se alteran por modificación enzimática. Los ejemplos de varias actividades potenciales que entran en estas diversas categorías y que podrían ser útiles para la escisión basolateral de las construcciones de vehículo-conector-carga incluyen miembros de la subfamilia de prolil oligopeptidasa S9B, por ejemplo, FAP y DDP IV, que se han descrito en la técnica.

Las secuencias de ácido nucleico y polinucleótidos de la presente descripción pueden prepararse por cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación de las secuencias apropiadas o por síntesis química directa por métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang, *et al.*, Meth. Enzymol., 68: 90-99 (1979); el método de fosfodiéster de Brown, *et al.*, Meth. Enzymol., 68: 109-151 (1979); el método de dietilfosforamidita de Beaucage, *et al.*, Tetra. Lett., 22: 1859-1862 (1981); el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts., 22(20): 1859-1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado como se describe en, por ejemplo, NeedhamVanDevanter, *et al.* Nucl. Acids Res. 12: 6159-6168 (1984); y el método en soporte sólido de la patente US 4458066. La síntesis química produce un oligonucleótido de una hebra. Este puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria o por polimerización con un ADN
30 polimerasa usando la hebra única como molde. Un experto en la materia reconocería que, aunque la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas por el ligamiento de secuencias más cortas.

Las secuencias de ácido nucleico de esta descripción pueden prepararse por técnicas de clonación. Los ejemplos de
45 técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos en la materia a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2.^a ED.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger y Kimmel (eds.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Academic Press, Inc., San Diego Calif. (1987)), o Ausubel, *et al.* (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987). La información del producto de los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen la empresa química SIGMA (Saint Louis, Mo.), R&D systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N.J.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza),
50 Invitrogen, San Diego, Calif. y Applied Biosystems (Foster City, Calif.), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas para los expertos en la materia.

Las células adecuadas para la replicación y para el mantenimiento de la expresión recombinante de proteínas son bien conocidas en la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según lo apropiado con el vector de
60 expresión particular y pueden cultivarse grandes cantidades de células que contienen el vector para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la proteína para aplicaciones clínicas. Dichas células pueden incluir microorganismos procariontes, tales como *E. coli*; diversas células eucariotas, tales como células de ovario de gáster chino (CHO), NSO, 292; levaduras; células de insecto; y animales transgénicos y plantas transgénicas, y similares. Se conocen tecnologías convencionales en la técnica para expresar genes
65 foráneos en estos sistemas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una fusión genética o construcción química de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo. Excepto en la medida en que cualquier excipiente, medio o vehículo convencional sea compatible con las construcciones de suministro de la presente invención se contempla su uso en las preparaciones farmacéuticas de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de compuestos activos pueden prepararse con un vehículo que protegerá la composición contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos de la preparación de dichas formulaciones están patentados o son globalmente conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

Las construcciones de suministro de la invención pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede encerrarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, a las construcciones de suministro se les puede incorporar excipientes y usarse en forma de comprimidos ingerible, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por administración diferente de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material para prevenir su inactivación.

Globalmente, se administra una cantidad farmacéuticamente eficaz de la construcción de suministro de la invención a un sujeto. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente si la dosificación de la construcción de suministro es suficiente para suministrar una cantidad eficaz de la macromolécula, como se describe a continuación. Puede administrarse entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 1 g de construcción de suministro. Puede administrarse entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 500 mg de la construcción de suministro. Puede administrarse entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 100 mg de la construcción de suministro. Puede administrarse entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 1000 μg de la construcción de suministro. Puede administrarse entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 250 μg de la construcción de suministro. Puede administrarse entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 100 μg de la construcción de suministro. Preferentemente, puede administrarse entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 50 μg de la construcción de suministro.

Las construcciones de suministro de la invención ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para suministro local o sistémico de macromoléculas a un sujeto. La más destacada entre dichas ventajas es la capacidad de suministrar la macromolécula sin usar una aguja para perforar la piel del sujeto. Muchos sujetos requieren dosis regulares repetidas de macromoléculas. Por ejemplo, los diabéticos deben inyectarse insulina varias veces al día para controlar las concentraciones de azúcar en la sangre. La calidad de vida de dichos sujetos mejoraría enormemente si el suministro de una macromolécula pudiera conseguirse sin inyección, evitando el dolor o las complicaciones potenciales asociados con la misma.

Además, muchas realizaciones de las construcciones de suministro pueden construirse y expresarse en sistemas recombinantes. La tecnología recombinante permite preparar una construcción de suministro que tiene un sitio de inserción diseñado para la introducción de cualquier macromolécula adecuada. Dichos sitios de inserción permiten a los expertos en la materia producir rápida y fácilmente construcciones de suministro para suministrar nuevas macromoléculas, si surge la necesidad de hacerlo.

Además, la conexión de la macromolécula al resto de la construcción de suministro con un conector que se escinde por una enzima presente en una membrana basolateral de una célula epitelial permite que la macromolécula se libere de la construcción de suministro y se libere del resto de la construcción de suministro poco después de la transcitosis a través de la membrana epitelial. Dicha liberación reduce la probabilidad de inducción de una respuesta inmunitaria contra la macromolécula. También permite que la macromolécula interactúe con su diana libre del resto de la construcción de suministro.

65

Otras ventajas de las construcciones de suministro de la invención serán evidentes para los expertos en la materia.

Ejemplo 1

5 Se preparó una construcción plasmídica que codifica Cholix madura de *Vibrio cholera* y se usa para expresar la proteína Cholix madura en un sistema de expresión de *E. coli* como se describe previamente; véase, por ejemplo, Jorgensen, R. *et al.*, *J Biol Chem*, 283(16): 10671-10678 (2008). También se prepara una forma mutante no tóxica del gen Cholix (denominado en lo sucesivo "ntCholix") por eliminación genética de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 581 ($\Delta E581$) que es análoga a una eliminación ($\Delta E553$) en la proteína PE que la vuelve no tóxica sin
 10 alterar significativamente su conformación; Killeen, K.P. y Collier, R.J., *Biochim Biophys Acta*, 1138: 162-166 (1992). La expresión de la proteína se consiguió usando células HD5 α de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) después de su transformación por choque térmico (1 min a 42 °C) con el plásmido apropiado. Las células transformadas, seleccionadas en medio que contiene antibiótico, se aislaron y cultivaron en caldo Luria-Bertani (Difco). La expresión de la proteína se indujo por la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. Dos horas después de la inducción con IPTG, las células se recogieron por centrifugación a 5000 xg durante 10 min a 4 °C. Los cuerpos de
 15 inclusión se aislaron después de la lisis celular y las proteínas se solubilizaron en guanidina HCl 6 M y EDTA 2 mM (pH 8,0) más ditiotreitól 65 mM. Después del replegamiento y la purificación, las proteínas se almacenaron a ~ 5 ml/ml en PBS (pH 7,4) que carece de Ca²⁺ y Mg²⁺ a -80 °C. Todas las proteínas usadas en estos estudios se confirmaron en una pureza de > 90 % basándose en la cromatografía de exclusión por tamaño.

20 La forma ntCholix entonces se modificó en su extremo C-terminal para permitir el acoplamiento químico directo a través de un resto sulfhidrilo libre localizado cerca del extremo C-terminal de la proteína. La estrategia para la modificación C-terminal se representa en la figura 1. La modificación C-terminal incluía un bucle restringido de cisteína que alberga la secuencia de escisión consenso (ENLFQS) para la proteasa altamente selectiva del virus del grabado del tabaco (TEV), una segunda cisteína y una marca de hexahistidina (His₆). La segunda Cys se incluyó para formar un puente disulfuro con la Cys finalmente usada para el acoplamiento. Añadir la secuencia de His₆ a la proteína simplificó la purificación y la secuencia de escisión de TEV proporcionó un mecanismo para eliminar selectivamente el resto de Cys terminal después de reducción suave. La escisión de TEV y la reducción suave con ditiotreitól 0,1 mM después de la expresión y aislamiento de las construcciones de ntCholix permitió el acoplamiento
 25 químico directo de una carga, colorante fluorescente Alexa Fluor® 488, mediante una reacción basada en maleimida como un mecanismo genérico de unión de una carga. La construcción resultante se menciona en la presente memoria como ntCholix-Alexa488. Después de la escisión con la proteasa de TEV, la reducción y el acoplamiento de la carga a través de una reacción de maleimida con el sulfhidrilo libre, se consiguió la eliminación de la secuencia C-terminal libre por una segunda etapa de cromatografía en columna de Ni²⁺.

Ejemplo 2

El transporte transepitelial de ntCholix-Alexa488 se evaluó usando monocapas de Caco-2 *in vitro*. En primer lugar, se cultivaron células Caco-2 (número de pase 25-35) hasta monocapas confluyentes como se describe previamente; Rubas, W. *et al.*, *Pharm Res*, 10: 113-118 (1993). En resumen, las células se mantuvieron a 37 °C en medio DMEM/de alto crecimiento enriquecido con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 % y 100 unidades de penicilina/estreptomicina en una atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad del 90 %. Las células se pasaron cada semana a una relación de división 1:3 en matraces de 75 cm² y se sembraron en soportes de filtro de policarbonato (Transwell™) permeables recubiertos con colágeno y prehumedecidos (0,4 μ m de tamaño de poro) de Corning
 40 Costar (Cambridge, MA) a una densidad de 63 000 células/cm². El medio de cultivo se reemplazó en días alteros. Las monocapas confluyentes, determinadas por la adquisición de resistencia transepitelial (TEER) significativa determinada usando un volt-ohmímetro (World Precision Instruments, Sarasota, FL), se usaron 20-26 días después de la siembra.

50 También se prepararon dos materiales adicionales para usarse como controles para evaluar el transporte *in vitro* de Cholix. Como control interno para el daño de los filtros, se obtuvo dextrano de 70 kDa marcado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) de una fuente comercial (Sigma). Como control para el transporte no específico mediado por colorante se hicieron reaccionar algunas de las aminos libres sobre la superficie de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma) con succinimidil éster ácido carboxílico Alexa488 (A488-CASE; Invitrogen). La reacción de
 55 acoplamiento se realizó durante 4 h a temperatura ambiente a pH neutro a una relación molar de 10:1 de A488-CASE:BSA, punto en el cual se añadió un exceso de glicina para interrumpir la reacción. El producto purificado resultante contenía ~ 3 moléculas de Alexa488 por molécula de BSA. Se usó dextrano de 70 kDa marcado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma) como control interno para el daño de los filtros. Las mediciones de fluorescencia se hicieron usando un instrumento BMG labtech FLUOstar Omega configurado a 540 nm de excitación y 610 nm de emisión para TRITC-dextrano (óptimo Ex = 547 y Em = 572) y 480 nm de excitación y 520 nm de emisión para las proteínas Alexa488 (óptimo Ex = 496 y Em = 519).

Las tasas de flujo de transporte transepitelial se midieron *in vitro* en dirección apical (Ap) a basolateral (Bl) y en dirección B1 a Ap usando monocapas polarizadas de células Caco-2 para describir los eventos de flujo mucosa a
 65 serosa y serosa a mucosa, respectivamente. Justo antes del inicio de un estudio de transporte, se midió la

resistencia transepitelial (TEER) de cada filtro; se excluyeron monocapas TEER con lectura de $< 200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ del estudio. Se retiró el medio Ap y B1 de las monocapas incluidas y estas superficies se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Un conjunto de monocapas entonces recibió una aplicación Ap (donante) de 100 μl de PBS que contenía 10 μg de ntCholix-A488 y 10 μg de TRITC-dextrano o 10 μg de BSA-A488 y 10 μg de TRITC-dextrano. Los compartimentos receptores (BI) entonces recibieron 500 μl de PBS para establecer el T_0 para el estudio de transporte. Tanto los compartimentos donantes como los compartimentos receptores se mostraron después de 4 h de incubación a 37 °C para determinar la cantidad de material transportado a través de la monocapa y la cantidad retenida en la superficie apical, respectivamente.

Después de 4 horas de exposición se observaron ~ 5 % del material añadido a la superficie apical de estas monocapas a transportar (véase la figura 2). Cualquier filtro que muestre niveles de TRITC-dextrano de 75 kDa en el comportamiento basal se excluyó del análisis. Una proteína de control de BSA-Alexa488 no logró mostrar ningún nivel significativo en el compartimento basal sobre este mismo periodo de 4 h (véase la figura 2). Los promedios de transporte fueron $5025 \pm 1,13 \%$ para Cholix y $0,56 \pm 0,33$ para BSA ($N = 4$). Estos datos establecen que la forma detoxificada genéticamente de Cholix puede transportarse de forma eficaz *in vitro* a través de monocapas polarizadas de una línea de células cancerosas intestinales humanas Caco-2.

Ejemplo 3

También se preparó y se expresó en *E. coli* una variante de Cholix truncada en el aminoácido A³⁸⁶ (Cholix³⁸⁶), así como un ligamiento genético de la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal de Cholix³⁸⁶ (Cholix³⁸⁶GFP). La expresión de la proteína se consiguió usando células DH5 α de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) después de la transformación por choque térmico (1 min a 42 °C) con el plásmido apropiado. Las células transformadas, seleccionadas en medio que contiene antibiótico, se aislaron y cultivaron en caldo Luria-Bertani (Difco). La expresión de la proteína se indujo por adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. Dos horas después de la inducción con IPTG, las células se recogieron por centrifugación a 5000 xg durante 10 min a 4 °C. Los cuerpos de inclusión se aislaron después de la lisis celular y las proteínas se solubilizaron en guanidina HCl 6 M y EDTA 2 mM (pH 8,0) más ditiotreitól 65 mM. Después del replegamiento y la purificación, las proteínas se almacenaron a ~ 5 ml/ml en PBS (pH 7,4) que carece de Ca²⁺ y Mg²⁺ a -80 °C. El replegamiento de Cholix³⁸⁶GFP se controló por la adquisición y retención de la característica de fluorescencia asociada con esta proteína fluorescente; Sample *et al.*, Chem Soc Rev, 38(10): pág. 2852-64 (2009). La proteína fluorescente verde (GFP) se adquirió de Upstate (Charlottesville, VA). Todas las proteínas usadas en estos estudios se confirmaron en una pureza de $> 90 \%$ basada en cromatografía de exclusión por tamaño.

Se obtuvieron microesferas de poliestireno (10 nm de diámetro) que contenían un colorante fluorescente rojo integrado de forma covalente con propiedades de excitación/emisión de 468/508 nm y que tenían grupos funcionales superficiales aldehído (XPR-582) de Duke Scientific (Palo Alto, CA). Se mezclaron 100 μl de microesferas XPR-582 (a un 2 % de sólidos) con aproximadamente 2,5 nmol de GFP o Cholix³⁸⁶GFP en un volumen final de 200 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) neutra (pH 7,0). Después de 2 h de balanceo suave a temperatura ambiente, se añadieron 20 μl de una solución de 2 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma, St. Louis, MO) en PBS. Las preparaciones entonces se dializaron por tres ciclos de dilución con PBS y concentración usando un dispositivo de filtro Microcon con punto de corte de peso molecular de 100 000 de Millipore (Bedford, MA). Las preparaciones finales de las microesferas recubiertas estaban a un 1 % de sólidos.

Ejemplo 4

Se mantuvieron células A549 (ATCC CCL-185™), L929 (ATCC CRL-2148™) y Caco-2 (ATCC HTB-37™) en CO₂ al 5 % a 37 °C en medio completo: medio de Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM F12) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2,5 mM, 100 U de penicilina/ml y 100 μg de estreptomina/ml (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Las células se alimentaron cada 2 a 3 días con este medio (medio completo designado) y se pasaron cada 5 a 7 días. Para los ensayos, las células se sembraron en placas de 24 o 96 pocillos y se cultivaron hasta confluencia.

Se cultivaron células Caco-2 como monocapas confluyentes en soportes transwell de membrana de policarbonato de 0,4 μm de tamaño de poro recubiertos con colágeno (Corning-Costar, Cambridge, MA) y se usaron 18-25 días después de obtener una resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de $> 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ medida usando un voltímetro de pabillo Millicell-ERS® (Millipore). El transporte apical a basolateral (A→B) y basolateral a apical (B→A) de Cholix o Cholix³⁸⁶GFP a través de estas monocapas se determinó midiendo la cantidad de proteína transportada 4 h después de una aplicación de 20 μg a 37 °C. Las mediciones de TEER y el grado de dextrano fluorescente de 10 kDa (medido usando un protocolo de exclusión por tamaño de HPLC) se usaron para verificar las propiedades de barrera de la monocapa durante el transcurso del estudio. El grado de transporte de Cholix se determinó por titulación del medio recogido en el ensayo de citotoxicidad basado en células. Se midió Cholix³⁸⁶GFP transportada por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpo anti-GFP para la captura y los sueros policlonales contra Cholix para la detección.

Las tasas de transporte a través de monocapas de células Caco-2 polarizadas *in vitro* fueron comparables para

Cholix, ntCholix y Cholix³⁸⁶GFP evaluadas por análisis en formato ELISA. En el caso de Cholix, las células Caco-2 polarizadas no se intoxicaron por la proteína cuando se examinaron para la detección por TUNEL de la apoptosis o la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). De forma importante, se descubrió que Cholix y quimeras proteicas basadas en Cholix se transportan de forma eficaz desde la superficie apical a la basolateral de monocapa de Caco-2 pero no en la dirección basolateral a apical. Estas tasas de transporte y direccionalidad fueron comparables con las observadas previamente para PE ensayada en este mismo formato. Adicionalmente, se observó que la adición de antisuero de conejo anti-Cholix no lograba bloquear el transporte eficaz de Cholix o proteínas relacionadas con Cholix a través de monocapas de Caco-2 *in vitro*.

Se usó microscopia de fluorescencia confocal para examinar la naturaleza de la transcitosis de Cholix³⁸⁶GFP a través de monocapas de Caco-2 *in vitro*. Un estudio del transcurso del tiempo mostró que Cholix³⁸⁶GFP entraba en células epiteliales en 5 minutos desde su aplicación apical y se transportaba a través de las células hasta la región basolateral de la célula en 15 minutos. En muestras expuestas a Cholix³⁸⁶GFP apical durante 15 minutos con posterior eliminación del exceso de Cholix³⁸⁶GFP desde la cámara apical, se observó que la fluorescencia de GFP continuaba en la dirección de la superficie basolateral de la célula y no de vuelta hacia la superficie apical. Este movimiento unidireccional de Cholix³⁸⁶GFP se confirmó midiendo el contenido de Cholix³⁸⁶GFP en los compartimentos apical y basolateral sobre este transcurso de tiempo. La aplicación de Cholix³⁸⁶GFP en la superficie basolateral de monocapas de Caco-2 no mostró ninguna entrada de fluorescencia significativa en las células, coherente con los estudios de transporte. El análisis de transferencia de Western de Cholix, ntCholix y Cholix³⁸⁶GFP transportada sugirió que estas proteínas se transportaban sin mayores alteraciones.

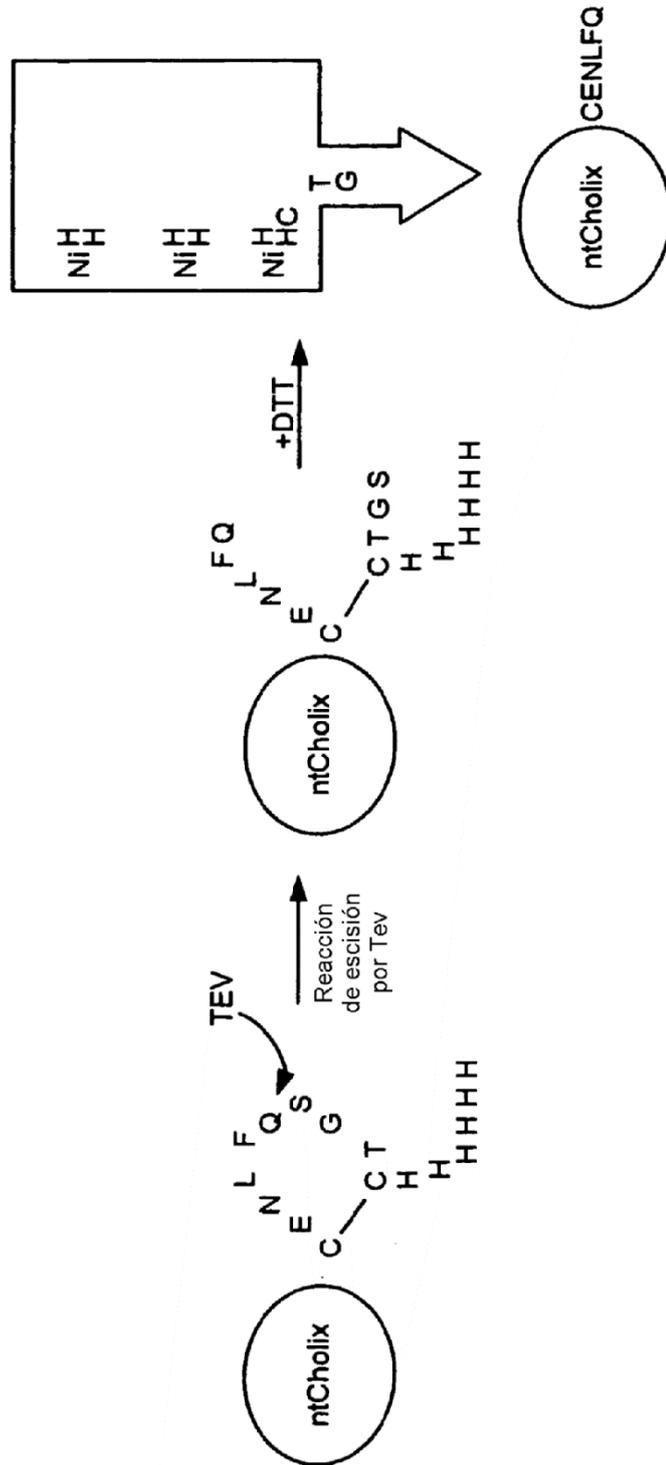
Los estudios *in vitro* también demostraron que microesferas de látex fluorescentes de 100 nm de diámetro acopladas químicamente a Cholix³⁸⁶GFP se transportaban de forma eficaz a través de monocapas de Caco-2 después de una aplicación apical. La selección de microesferas de látex con un diámetro de 100 nm proporcionó un material que podía ajustarse fácilmente dentro del lumen de un endosoma de 125 nm de diámetro derivado de un pozo recubierto con claterina. Por tanto, estos estudios sugieren que las microesferas de látex con Cholix³⁸⁶GFP se mueven a través de células Caco-2 polarizadas por un mecanismo coherente con la captación de endosomas en la superficie celular apical seguido por tráfico intracelular basado en endosomas. La preincubación de microesferas de látex fluorescentes de 100 nm de diámetro acopladas a Cholix³⁸⁶GFP con antisueros anti-Cholix no logró alterar el transporte de estas microesferas. Una cantidad similar de GFP acoplada químicamente a microesferas de látex fluorescente de 100 nm de diámetro no facilitaba el transporte *in vitro* de estas partículas a través de monocapas de Caco-2. Los estudios de microscopia de fluorescencia confocal fueron coherentes con las diferencias observadas en transcitosis para microesferas de látex recubiertas con Cholix³⁸⁶GFP frente a GFP.

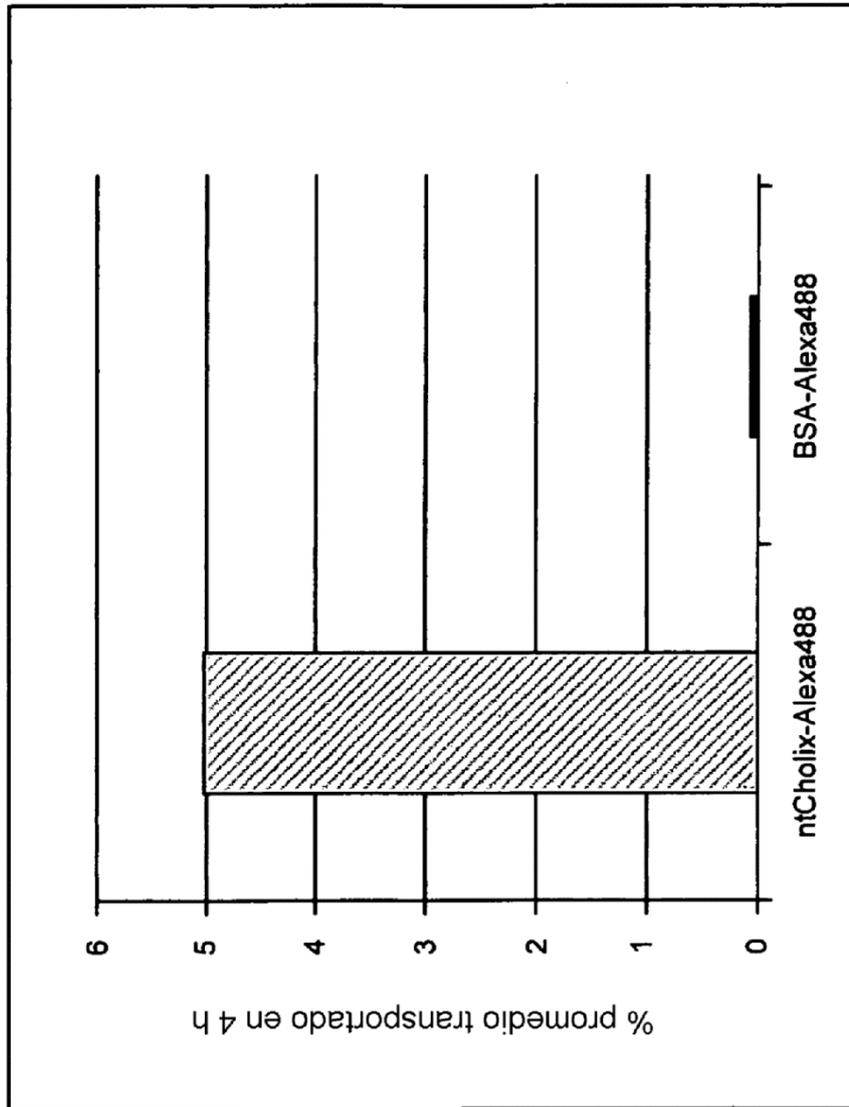
El resultado de que Cholix es capaz de transportarse a través de barreras epiteliales polarizadas de forma similar a PE es imprevisto. Aunque sus estructuras son similares como se sugiere por el análisis cristalográfico, su composición de aminoácidos superficiales es sorprendentemente diferente; de hecho, los métodos de alineación basados en similitud de aminoácidos no coincidirían fácilmente estas dos proteínas. Esto es importante porque la capacidad de una proteína derivada de patógenos, tal como estos dos factores de virulencia, de interactuar con los receptores de la célula hospedadora se presume que implica componentes aminoacídicos expresados en superficie. Como estas dos proteínas (con sus secuencias de aminoácidos sustancialmente diferentes) se transforman de forma eficaz a través de epitelios polarizados, es muy probable que algún otro mecanismo forme esa base para esta capacidad de transporte. Es nuestra opinión que las relaciones estructurales compartidas por PE y Cholix forma la base de la capacidad inherente para su eficaz transcitosis. Aunque ambas proteínas PE y Cholix tendrían la capacidad de unirse a un receptor superficial apical para obtener acceso a los compartimentos endosómicos, es más probable que esta interacción y el potencial para otros receptores implicados en el tráfico intracelular de estas proteínas se base en estructuras conformacionales en lugar de en aminoácidos específicos en la superficie de la proteína.

Todos los artículos y métodos divulgados y reivindicados en la presente memoria pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque los artículos y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a los artículos y métodos todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. La invención descrita de forma ilustrativa en la presente memoria puede ponerse en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento no divulgado específicamente en la presente memoria. Por tanto, por ejemplo, en cada caso en la presente memoria cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede remplazarse con cualquiera de las otras dos expresiones. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por tanto, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos divulgados en la presente memoria, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de suministro no tóxica aislada que comprende: una toxina Cholix modificada que comprende 1) los residuos aminoacídicos Val¹-Ala³⁸⁶ y 2) está truncada en el residuo Ala³⁸⁶ o está eliminado el residuo Glu⁵⁸¹; y una carga terapéutica acoplada a la toxina Cholix modificada, siendo capaz la construcción de suministro aislada de suministrar la carga terapéutica.
2. Una construcción de suministro aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el suministro es sin inyecciones.
3. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además un conector escindible.
4. La construcción de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicha carga se selecciona del grupo que consiste en: macromoléculas, moléculas pequeñas, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plásmido y moléculas antisentido.
5. La construcción de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicha carga es una citocina.
6. Carga de la reivindicación 1 para su uso como medicamento, en la cual la construcción de la reivindicación 1 se usa para el suministro de la carga.
7. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de suministro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la cual la composición farmacéutica es para administración oral, administración tópica, administración pulmonar, administración intranasal, administración bucal, administración sublingual o administración ocular, preferiblemente para administración oral.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la cual la composición farmacéutica se formula en una cápsula o comprimido.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la cual la composición farmacéutica comprende de 1 µg a 1 g de la construcción de suministro aislada.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la cual la composición farmacéutica comprende de 10 µg a 100 mg de la construcción de suministro aislada.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la cual la composición farmacéutica comprende de 10 µg a 1000 µg de la construcción de suministro aislada.
13. Un polinucleótido que codifica una construcción de suministro de acuerdo con la reivindicación 1.
14. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.





REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4458066 A [0042]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- MAHATO, R.I. et al. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2003, vol. 20 (2-3), 153-214 [0002]
- WOODLEY, J.F. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1994, vol. 11 (2-3), 61-95 [0003]
- T. JUNG et al. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, vol. 50, 147-160 [0004]
- ROSZAK, D.B. ; COLWELL, R.R. *Microbiol Rev*, 1987, vol. 51, 365-379 [0007]
- YATES, S.P. et al. *Trends Biochem Sci*, 2006, vol. 31, 123-133 [0007]
- MRSNY, R.J. et al. *Drug Discov Today*, 2002, vol. 7 (4), 247-58 [0008] [0013]
- WEDEKIND, J.E. et al. *J Mol Biol*, 2001, vol. 314, 823-837 [0008]
- DENG, Q. ; J.T. BARBIERI. *Annu Rev Microbiol*, 2008, vol. 62, 271-88 [0008]
- FITZGERALD, D.J. et al. *J Cell Biol*, 1995, vol. 129 (6), 1533-41 [0008]
- KOUNNAS, M.Z. et al. *JBiol Chem*, 1992, vol. 267 (18), 12420-3 [0008]
- MATTOO, S. ; Y.M. LEE ; J.E. DIXON. *Curr Opin Immunol*, 2007, vol. 19 (4), 392-401 [0008]
- SPOONER, R.A. et al. *Virology*, 2006, vol. 3, 26 [0008]
- JORGENSEN, R. et al. *JBiol Chem*, 2008, vol. 283 (16), 10671-10678 [0010] [0026] [0053]
- SARNOVSKY, R. et al. *Immunol Immunother*, 2010, vol. 59, 737-746 [0012]
- NARANG et al. *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 90-99 [0042]
- BROWN et al. *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 109-151 [0042]
- BEAUCAGE et al. *Tetra. Lett.*, 1981, vol. 22, 1859-1862 [0042]
- BEAUCAGE ; CARUTHERS. *Tetra. Letts.*, 1981, vol. 22 (20), 1859-1862 [0042]
- NEEDHAM-VANDEVANTER et al. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 6159-6168 [0042]
- SAMBROOK et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, vol. 1-3 [0043]
- GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES. Academic Press, Inc, 1987 [0043]
- CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1987 [0043]
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, Inc, 1978 [0046]
- KILLEEN, K.P. ; COLLIER, R.J. *Biochim Biophys Acta*, 1992, vol. 1138, 162-166 [0053]
- RUBAS, W. et al. *Pharm Res*, 1993, vol. 10, 113-118 [0055]
- SAMPLE et al. *Chem Soc Rev*, 2009, vol. 38 (10), 2852-64 [0059]