

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 218**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2015** **PCT/IB2015/057448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16051340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2015** **E 15791743 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 3186192**

54 Título: **Una proteína de fusión, una nanopartícula compuesta por una pluralidad de monómeros de dicha proteína de fusión y usos de la misma**

30 Prioridad:

30.09.2014 IT TO20140779

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

24.04.2018

73 Titular/es:

THENA BIOTECH S.R.L. (100.0%)

**Via Ufente 20
04100 Latina, IT**

72 Inventor/es:

**CECI, PIERPAOLO y
FALVO, ELISABETTA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 665 218 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

Una proteína de fusión, una nanopartícula compuesta por una pluralidad de monómeros de dicha proteína de fusión y usos de la misma

La presente invención se refiere a una proteína de fusión, nanopartículas compuestas de una pluralidad de monómeros de dicha proteína de fusión, ácidos nucleicos que codifican dicha proteína de fusión, y aplicaciones diagnósticas y terapéuticas de los mismos.

La liberación selectiva de agentes terapéuticos en áreas enfermas representa uno de los desafíos más importantes para mejorar las terapias actuales. En este contexto, el uso de nanopartículas como vehículos (nanovectores) de agentes terapéuticos potencialmente permite eludir las barreras biológicas que pueden estar presentes entre el sitio de administración y la diana final y, más específicamente, acumular el fármaco de forma selectiva en el área enferma en lugar de tejidos normales. Como requisito previo fundamental, el nanovector debe ser capaz de unir grandes cantidades del fármaco de una manera efectiva.

Entre los vehículos conocidos de liberación dirigida de un fármaco, las nanopartículas basadas en ferritinas (Fts) son cada vez más interesantes gracias a sus características extraordinarias de biocompatibilidad, capacidad de cruzar barreras biológicas, versatilidad de funcionalización y capacidad de unión de ciertos tipos de fármacos (Vannucci, L., Falvo, E., Ceci, P. Multifunctional Protein-Based Nanoparticles for Cancer Theranosis. 2014, A. Prokop et al. (eds.), Intracellular Delivery II, Fundamental Biomedical Technologies 7). Las Fts son estructuras de proteínas multiméricas muy simétricas que constan de 24 subunidades que se ensamblan en una estructura molecular con una cubierta esencialmente esférica, que encierra una cavidad que se usa fisiológicamente para almacenar hierro. El diámetro exterior y el diámetro interior son 12 y 8 nm, respectivamente. Dicha estructura molecular en forma de concha se denominará en lo sucesivo "nanopartícula" o "nanopartícula de HfT".

Las nanopartículas basadas en la cadena pesada de la ferritina humana (HFt) muestran una serie de ventajas en comparación con otros sistemas de liberación de fármacos, especialmente en relación con aplicaciones humanas *in vivo*. De hecho, las moléculas de HFt están diseñadas para atravesar las barreras biológicas (diámetro menor de 20 nm) y están presentes tanto dentro de las células como en la sangre en condiciones fisiológicas, aunque a bajas concentraciones (aproximadamente 20 µg/l).

Al ser elementos naturales, es menos probable que provoquen un fuerte anticuerpo no propio (extraño) y/o respuesta inmunitaria de linfocitos T.

Además, la HFt es una de las pocas nanopartículas naturales que es capaz de unirse a las células tumorales de manera efectiva y selectiva. De hecho, cuando se usa una de las moléculas más atractivas para la terapia dirigida contra el cáncer, el receptor de transferrina 1 (TfR1), se ha demostrado que HFt se internaliza. El TfR1 está de hecho regulado en la superficie de muchos tipos de cáncer (hasta 100 veces más que en las células normales) y se internaliza eficientemente. En más de 474 muestras de tejido clínico, la HFt, pero no la cadena ligera de la ferritina humana (LFt), se ha demostrado que se internaliza por TfR1 y reconoce específicamente muchos tipos de tumores (es decir, hígado, pulmón, páncreas, colon, cuello uterino, ovario, cáncer de próstata, mama, sarcoma y de timo) en comparación con los tejidos no tumorales, con un 98 % de sensibilidad y un 95 % de especificidad (Fan K, Cao C, Pan Y, Lu D, Yang D, Feng J, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. Nat Nanotechnol. 2012;7:459-64).

Sin embargo, la HFt nativa presenta algunas desventajas. En primer lugar, los rendimientos con los que es capaz de unir ciertos tipos de fármacos, como por ejemplo la doxorrubicina (uno de los fármacos antineoplásicos con amplio espectro antitumoral) son bajos, y esto puede restringir su posible uso y desarrollo clínico. En segundo lugar, la HFt nativa tiene una semivida plasmática muy corta, aproximadamente 2-3 horas, cuando se inyecta a través de la ruta sistémica. Por último, su actividad ferroxidasa natural podría inhibir el desarrollo y la maduración de los osteoblastos humanos, y provocar una mineralización disminuida, osteopenia y osteoporosis (Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, Balla J. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. J Bone Miner Res. 2010;25:164-72). Por esta razón, es aconsejable utilizar una variante de HFt que carece de la actividad de ferroxidasa, obtenida por mutación específica del sitio (denominada en lo sucesivo vHFt), que no provoca inhibición.

Con el fin de resolver simultáneamente todas las desventajas enumeradas anteriormente con respecto a la HFt nativa, los presentes inventores decidieron modificar genéticamente la cadena pesada de la ferritina humana (HFt) actuando directamente sobre la superficie externa de la proteína. Al hacerlo, la capacidad para encapsular el fármaco doxorrubicina dentro de la cavidad proteica mejoró drástica y sorprendentemente, y la semivida plasmática se amplió sin afectar la capacidad de la proteína de reconocer las células tumorales.

Este y otros objetos se logran a través de la proteína de fusión como se define en la reivindicación 1 adjunta. Las otras reivindicaciones independientes y las reivindicaciones dependientes se refieren a aspectos adicionales y realizaciones específicas de la invención, que forman una parte integral de la memoria descriptiva.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán a partir de la siguiente descripción detallada, que se proporciona con fines ilustrativos únicamente y no a modo de limitación, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 La Figura 1 es una representación esquemática de la fabricación de nanopartículas de HFt, en las que el extremo N de cada uno de los 24 monómeros está unido genéticamente a secuencias peptídicas escindibles y a secuencias que consisten esencialmente en prolina, alanina y serina (PAS). En aras de la claridad, solo se muestran 5 de los 24 extremos N terminales presentes.
- 10 La Figura 2 es una representación esquemática de la fabricación de nanopartículas de HFt que portan moléculas terapéuticas y/o de diagnóstico. Estas pueden cargarse en la cavidad interna o unirse a la superficie externa de la proteína.
- 15 La Figura 3 es un diagrama general que describe el modo de acción de las nanopartículas de HFt en células tumorales.
- 20 La Figura 4 muestra el perfil de expresión de proteínas de una de las construcciones establecidas, HFt-MMP-PAS75 (longitud PAS: 75 restos), mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie R-250. La proteína recombinante se fabricó en *E. coli* BL21DE3 usando un plásmido inducible por IPTG, pet-11a, y se purificó como se describe en la sección relacionada con los ejemplos. Carril 1: SDS-PAGE de fracciones solubles e insolubles de células no inducidas por IPTG. Carril 2: SDS-PAGE de fracciones solubles e insolubles de células inducidas con IPTG 0,5 mM. La banda HFt-MMP-PAS está indicada por la flecha negra y migra a aproximadamente 40 kDa, a diferencia de una masa calculada de 28,5 kDa. Este fenómeno es consistente con otros descritos para las proteínas PASiladas y se debe a una unión reducida de SDS de las secuencias PAS. Además, las secuencias de PAS se tiñen débilmente con azul de Coomassie, lo que conduce a la subestimación de la banda de proteína en el gel.
- 25 La Figura 5 muestra los perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de la HFt nativa (líneas de puntos) y de las construcciones de proteínas de fusión HFt-MMP-PAS75 (líneas continuas), HFt-MMP-PAS40 (líneas discontinuas y de puntos) o de HFt funcionalizada con polietilenglicol (PEG) 5kDa (HFt-PEG5K, líneas discontinuas).
- 30 La Figura 6 muestra los perfiles típicos de cromatografía de exclusión por tamaño de HFt-MMP-PAS75, antes (líneas continuas) y después (líneas de puntos) de la eliminación de PAS por las proteasas MMP-2/9 (Colagenasa IV) *in vitro*.
- 35 La Figura 7 muestra los perfiles de migración de las bandas de HFt-MMP-PAS75, antes y después de la eliminación de PAS por las proteasas MMP-2/9 (Colagenasa IV) *in vitro*. La SDS-PAGE se tiñó con Azul de Coomassie R-250. Carril 1: marcador de proteína; Carril 2: HFt (1 mg/ml); Carril 3: HFt-MMP-PAS75 (2 mg/ml) después de la digestión *in vitro* con 0,2 mg/ml de proteasas MMP-2/9 (colagenasa IV); Carril 4: HFt-MMP-PAS75 (2 mg/ml) después de la digestión *in vitro* con 0,2 mg/ml de proteasas MMP-2/9 (colagenasa IV).
- 40 La Figura 8 muestra la capacidad de encapsular doxorrubicina por dos de las construcciones establecidas (HFt-MMP-PAS40 y HFt-MMP-PAS75) en comparación con la de la proteína nativa HFt y con otros datos de la literatura. Los rendimientos relativos están indicados en términos de % de recuperación de proteína y número de moléculas de doxorrubicina encapsuladas. Se puede observar que las construcciones objeto de esta patente han adquirido sorprendentemente e inesperadamente una capacidad mejorada de encapsular el fármaco doxorrubicina en al menos un factor de 6 en comparación con la HFt nativa.
- 45 La Figura 9 muestra la estabilidad de los complejos de ferritina-doxorrubicina (HFt-DOXO, HFt-MMP-PAS40-DOXO y HFt-MMP-PAS75-DOXO) a 4 °C y 37 °C en términos de % de liberación del fármaco a lo largo del tiempo. Debido a las modificaciones llevadas a cabo en la HFt descritas en esta patente, la construcción HFt-MMP-PAS40 (los mismos resultados también se obtuvieron con HFt-MMP-PAS75) es mucho más estable (menor porcentaje de fármaco liberado en el tiempo cuando se almacena a 4 o 37 °C) en su forma unida a fármaco en comparación con la construcción de HFt nativa correspondiente. El asterisco (*) indica que la cantidad de fármaco liberado no pudo determinarse más allá de este período de tiempo en muestras nativas de HFt, ya que el material tendía a volverse turbio y precipitar.
- 50 La Figura 10 muestra un perfil de cromatografía de exclusión por tamaño típico de HFt-MMP-PAS40-. DOXO con lecturas a 280 nm (líneas continuas) y 485 nm (líneas de puntos).
- 55 La Figura 11 muestra la actividad antiproliferativa de DOXORRUBICINA, HFt-MMP-PAS75 y HFt-MMP-PAS75-DOXO frente a células de sarcoma HT-1080.
- 60 La Figura 12 muestra los resultados de experimentos farmacocinéticos en compuestos que contienen doxorrubicina. Las concentraciones plasmáticas de doxorrubicina se calcularon en diferentes momentos (10, 60,
- 65

180, 360 y 1440 minutos) después de inyecciones intravenosas en ratones sanos de los fármacos solos doxorubicina e INNO-206 (una formulación de doxorubicina nueva y más activa) o de doxorubicina encapsulada en los compuestos a base de ferritina: HFt nativa, HFt-MMP-PAS40 y HFt-MMP-PAS75.

La Figura 13 muestra un experimento típico para evaluar el efecto terapéutico en ratones que portan un tumor pancreático humano (xenoinjertos). Se trataron grupos de ratones (n = 6), una vez que los tamaños del tumor alcanzaron aproximadamente 100 mm³ 4 veces (cada 4 días) con una dosis de 5 mg/kg de doxorubicina. Los compuestos probados fueron: INNO-206, HFt-MMP-PAS40-DOXO y HFt-MMP-PAS75-DOXO. En la figura, se muestra el peso del tumor (y de las imágenes representativas) después de aproximadamente 3 semanas desde el comienzo del tratamiento.

La proteína de fusión que es el objeto de la presente invención comprende al menos tres dominios.

El primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la ferritina humana. Dicha secuencia de aminoácidos es la secuencia nativa o es una variante de la secuencia nativa que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia. Dado que la cadena pesada de la ferritina humana tiene una longitud de 183 aminoácidos (SEQ ID NO: 1), una variante que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia contiene hasta 19 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa. Esta definición incluye, entre otros, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 de la variante vHFt mencionada anteriormente que carece de la actividad ferroxidasa, que representa una variante alternativa. La secuencia de aminoácidos de vHFt se caracteriza por dos sustituciones de aminoácidos: lisina en lugar de glutamato 62 y glicina en lugar de histidina 65.

El segundo dominio de la proteína de fusión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de al menos un sitio de escisión de metaloproteínasa de matriz (MMP), particularmente MMP-2, MMP-3, MMP-7 o MMP-9. Como un ejemplo no limitante, a continuación se enumeran algunos péptidos, que simulan la secuencia de escisión de la cadena de colágeno y se escinden de una manera particularmente efectiva mediante MMP-2 y MMP-9:

Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (SEQ ID NO: 3)
 Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln (SEQ ID NO: 4)
 Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Gly (SEQ ID NO: 5)
 Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly (SEQ ID NO: 6)
 Cys-Gly-Leu-Asp-Asp (SEQ ID NO: 7)

Las secuencias de aminoácidos que contienen el sitio de escisión para la enzima deseada también pueden construirse de tal manera que el sitio de escisión se repita varias veces, tal como, por ejemplo, en la secuencia que se muestra a continuación:

Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (SEQ ID NO: 8).

Todas las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente son ejemplos representativos, pero no limitativos, de la fabricación de las proteínas de fusión y las nanopartículas de acuerdo con la presente invención.

El tercer dominio de la proteína de fusión de la invención, unido al extremo N, consiste en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que es rico en prolina, serina y alanina (denominado "PAS" en aras de la brevedad), que tiene el objetivo de aumentar la estabilidad de la proteína durante el proceso de encapsulación del fármaco, preferiblemente para el fármaco doxorubicina, y de aumentar la estabilidad del complejo proteína-fármaco. La presencia de PAS también es capaz de enmascarar la superficie de la proteína y por lo tanto de ampliar su semivida plasmática.

El polipéptido PAS consiste principalmente en secuencias de aminoácidos ricas en Pro, Ala y Ser, que forman un polímero no estructurado, cuya longitud es preferiblemente inferior a 80 restos de aminoácidos, más preferiblemente está comprendido por entre 20 y 80 restos de aminoácidos, aún más preferiblemente está comprendido por entre 40 y 75 restos de aminoácidos. En una realización preferida, los restos de prolina del polipéptido PAS anteriormente mencionado son 10-40 % de los restos de aminoácidos totales del polipéptido PAS.

Ejemplos de polipéptidos PAS particularmente adecuados para ser utilizados dentro del alcance de la presente invención, y por lo tanto preferidos, son polipéptidos PAS de 40 o 75 restos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, los siguientes:

ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO 9)

ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPS

APAASPAAPAPASPAAPA (SEQ ID NO 10)

El polipéptido PAS estabilizador y enmascarante se añade a la superficie de HfT a través de una secuencia de péptido corta que, como se mencionó anteriormente, contiene uno o más sitios de escisión de metaloproteinasas, para proporcionar la proteína de fusión de la invención con una máscara desplazable. De hecho, el polipéptido PAS puede eliminarse selectivamente en los tejidos diana mediante metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP). En particular, se demostró que MMP-2 y MMP-9 son metaloproteinasas clave que están sobreexpresadas en el microambiente tumoral y están involucradas en la angiogénesis, invasión y metástasis tumoral.

El uso de polipéptidos PAS en la superficie multimérica de la ferritina dentro del alcance de la presente invención ofrece varias ventajas sobre la técnica anterior. Para encapsular un fármaco o moléculas pequeñas dentro de la cavidad proteica de la ferritina, hasta la fecha se han llevado a cabo las acciones más obvias, es decir, modificar directamente el fármaco o la propia cavidad interna de la proteína. De esta forma, se favorece la interacción entre el fármaco (o molécula pequeña) y los sitios de unión en la cavidad interna de la ferritina. Por ejemplo, primero se formó un complejo de la doxorrubicina con cobre (II) para aumentar el rendimiento de la encapsulación (Zhen Z et al., ACS Nano. 2013 Jun 25;7(6):4830-7). Las nanopartículas de oro se encapsularon modificando genéticamente la cavidad interna de la ferritina con un péptido de unión al oro (Zheng B et al. Nanotechnology. 2010 Jan 29; 21(4):045305). Sin embargo, los presentes inventores han decidido actuar directamente sobre la superficie externa de la proteína usando polímeros PAS inertes para estabilizar la proteína durante el cambio repentino de pH que generalmente se usa para la disociación (pH 2.0) y reasociación (pH 7,5) de la HfT en presencia del fármaco. La presencia del polímero PAS también podría limitar la unión no específica del fármaco en la propia superficie.

Además, la presencia de PAS también puede representar un método de ampliar la semivida plasmática de una proteína, como la compañía XL-protein GmbH ha propuesto recientemente para varias proteínas. De hecho, la tecnología designada como "PASilación" es capaz de ampliar la semivida plasmática de los biofármacos mediante el uso de una cadena de aminoácidos naturalmente no estructurada como una alternativa biológica al PEG (Schlapsch M, Binder U, Börger C, Theobald I, Wachinger K, Kisling S, Haller D, Skerra A. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. Protein Eng Des Sel. 2013, 26:489-501). Usando esta técnica, una proteína biológicamente activa se fusiona genéticamente con una secuencia polipeptídica que comprende varios cientos de restos de los aminoácidos pequeños prolina, serina y alanina (PAS). En general, una secuencia PAS consiste en 100-3000 restos (preferiblemente 400-600 restos) fusionados a una proteína biológicamente activa. Las proteínas biológicamente activas mencionadas en la patente WO 2008/155134 se incluyen dentro de las siguientes categorías: proteínas de unión, fragmentos de anticuerpos, citocinas, factores de crecimiento, enzimas, hormonas. La cadena pesada de la ferritina humana no se menciona y, especialmente en la forma vHfT, no pertenece a las categorías enumeradas. De acuerdo con los ensayos llevados a cabo por los presentes inventores, que se describirán con más detalle a continuación, para la cadena pesada de la ferritina humana (nativa o variante), la secuencia PAS puede ser mucho más corta que la descrita en el documento WO 2008/155134, por ejemplo, menos de 80 restos de aminoácidos. En otras palabras, explotando la capacidad particular de HfT para formar una nanopartícula que consiste en 24 monómeros, las secuencias PAS mucho más cortas resultan eficaces y eficientes en la prolongación de la semivida plasmática de HfT *in vivo*. La selección de la longitud del polipéptido PAS enmascarante es una etapa crítica en el desarrollo de una HfT provista de las características deseadas. De hecho, por un lado, la semivida *in vivo* debe ser lo suficientemente larga como para permitir la acumulación de HfT en el sitio deseado. Por otro lado, la HfT debe poder liberarse del polímero enmascarante en ambientes ricos en metaloproteinasas (MMP). Si la secuencia PAS es demasiado corta, la construcción podría eliminarse demasiado rápido del organismo. Si la secuencia PAS es demasiado larga, podría dificultar el cruce a través de barreras biológicas que la separan del tejido y las células diana (es decir, vasos sanguíneos, uniones estrechas, estroma tumoral, etc.) y/o enmascarar el sitio o sitios de escisión de MMP.

Además, el logro de un producto de proteína final que se sobreexpresa, completamente soluble y que se pliega y ensambla adecuadamente no es evidente de antemano cuando se modifica el extremo N terminal de la proteína, como en el caso de la proteína de fusión de la presente invención. De hecho, es bien sabido que la modificación N-terminal de una proteína puede alterar la expresión, la solubilidad y/o el plegamiento y el ensamblaje adecuados de la misma.

Todos estos resultados, particularmente la mejora de los rendimientos de encapsulación del fármaco doxorrubicina, se han logrado de manera sorprendente e inesperada por los presentes inventores, que construyeron nanopartículas basadas en la cadena pesada de la ferritina humana (HfT), en la forma nativa o en una forma variante (preferiblemente vHfT), utilizando tanto la tecnología de fusión génica como la tecnología de producción de proteínas recombinantes. En particular, como se describirá en detalle en la sección relacionada con los ejemplos, se realizaron construcciones genéticas, que, en una única secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN), codifican las tres secuencias expuestas en la Figura 1: i) HfT (o vHfT); ii) secuencias cortas de péptidos (MMP) escindibles por MMP-2/9; iii) secuencias polipeptídicas no estructuradas ricas en Pro, Ser y Ala (PAS) preferiblemente con una longitud comprendida entre 20 y 80 restos. Las secuencias ii) y iii) están unidas al extremo N de la HfT para un enmascaramiento reversible de la misma.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión HfT de la invención comprende una primera y/o segunda secuencia(s) de aminoácidos de enlazador que unen, respectivamente, el primer dominio con el segundo dominio

y/o el segundo dominio con el tercer dominio. La primera y/o la segunda secuencia de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Como ya se ha indicado anteriormente, las proteínas de fusión HFt obtenidas por los presentes inventores forman espontáneamente nanopartículas de HFt capaces de portar moléculas terapéuticas (compuestos químicos, anticuerpos monoclonales, péptidos, etc.) y/o de diagnóstico (Figura 2). En una realización preferida, al menos 5 moléculas terapéuticas y/o de diagnóstico están encapsuladas en la cavidad interna de la nanopartícula HFt o están unidas covalentemente a la superficie de la nanopartícula HFt. La cantidad de fármaco unido y la estabilidad del complejo proteína-fármaco en sí mismo aumentan considerablemente en comparación con la proteína no modificada gracias a la presencia de los polipéptidos PAS. Como se usa en la presente memoria, la expresión "estabilidad del complejo proteína-fármaco" se refiere a la capacidad de la proteína de fusión HFt para retener el fármaco en la cavidad y no para liberarlo a lo largo del tiempo durante la vida de almacenamiento del complejo. La liberación del fármaco de la proteína HFt antes de su uso final puede causar efectos no deseados, como precipitación, agrupamiento y pérdida del producto final.

Las nanopartículas de HFt de la presente invención, que actúan como sistemas de unión y liberación dirigidos para fármacos o agentes de diagnóstico, estarán temporalmente inactivas en la circulación y en tejidos que no expresan MMP o que los expresan de manera inadecuada, y posteriormente se activarán cuando alcanzan tejidos diana ricos en MMP (MMP-2/9) en los que se puede liberar su carga (Figura 3). Una molécula terapéutica es, por ejemplo, un principio activo farmacéutico. Como se usa en la presente memoria, la expresión "principio activo farmacéutico" o más simplemente "principio activo" se refiere a cualquier molécula farmacéuticamente activa (compuesto químico, anticuerpo monoclonal, péptido, etc.), por ejemplo, una molécula que puede usarse para el tratamiento del cáncer. Los principios activos preferidos para usar en la presente invención son, por ejemplo, sin limitación, doxorrubicina, paclitaxel, gemcitabina y principios activos basados en platino. También se puede usar un precursor de los principios activos enumerados anteriormente.

Una molécula de diagnóstico es, por ejemplo, un agente para diagnóstico por imagen. Como se usa en el presente documento, el término "agente para diagnóstico por imagen" se refiere a una molécula que permite la visualización de órganos, tejidos o sistemas corporales. Los ejemplos de agentes para diagnóstico por imagen incluyen agentes paramagnéticos, sondas ópticas y radionucleidos. El término "sonda óptica" se refiere a un compuesto fluorescente que puede detectarse mediante excitación a una primera longitud de onda y leyendo a una segunda longitud de onda. Ejemplos de sondas ópticas incluyen isotiocianato de fluoresceína y 5- (y 6)-carboxitetrametilrodamina, éster de succinimidilo.

En aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, las nanopartículas de HFt de la presente invención, que actúan como sistemas portadores dirigidos, pueden administrarse a un sujeto o paciente mediante cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, como supositorio, por vía intralesión, intranasal o subcutánea, intratecal, intralinfática, a través de la inhalación de microgotitas, o mediante implante de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo una bomba osmótica. Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a animales, tales como mamíferos, que incluyen seres humanos, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la evidencia de éxito o mejora en el tratamiento de una determinada enfermedad, lesión, afección o síntoma, o, en ciertas circunstancias, la prevención de la aparición de un síntoma o afección.

En aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas de HFt de la invención se usan para la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un principio activo farmacéutico. "Dosis terapéuticamente efectiva" significa una dosis que produce el efecto terapéutico para el que se administra. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, que incluyen el objetivo del tratamiento, el sujeto, la enfermedad que se va a tratar, etc., y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica usando metodologías conocidas per se (ver, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Las nanopartículas de HFt de la invención pueden usarse para tratar cualquier enfermedad que requiera la administración de un principio farmacéutico, por ejemplo, secuestrando el principio activo dentro de la cavidad de la nanopartícula o uniéndola covalentemente a la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas también se pueden usar para el diagnóstico, más particularmente para el diagnóstico por imagen de enfermedades, secuestrando un agente para diagnóstico por imagen dentro de la cavidad de la nanopartícula o uniéndola covalentemente a la superficie de la nanopartícula.

La nanopartícula de HFt de la presente invención se puede administrar a un sujeto para el tratamiento de cualquier enfermedad, preferiblemente una enfermedad hiperproliferativa, que incluye cáncer, por ejemplo: carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, sarcomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, glioblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y

cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer hepatobiliar, cáncer de vejiga, cáncer de intestino delgado, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de vesícula biliar, cáncer de pene, cáncer de uretra, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer vaginal, cáncer uterino, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer suprarrenal, cáncer pancreático endocrino, tumor carcinoide, cáncer de huesos, cáncer de piel, retinoblastomas, mielomas múltiples, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (ver CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V. T. et al. Edición 2008) para otros tipos de cáncer).

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no como una limitación del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de vectores de expresión para proteínas de fusión HfT-MMP-PAS40 y HfT-MMP-PAS75

Como primera etapa para diseñar una construcción HfT-MMP-PAS (o vHfT-MMP-PAS), se construyeron varios modelos moleculares basados en la estructura tridimensional de HfT, que se había determinado experimentalmente mediante cristalografía de rayos X y está disponible en el Protein Data Bank (PDB) con el código 3AJ0. Con el fin de modificar esta estructura de forma computacional, se utilizó el software de modelado molecular InsightII (Accelrys Inc.).

i) Para construir un modelo de la variante HfT descrita en Vannucci et al. (2012), que tiene un volumen hidrodinámico adecuado, se usó un polímero que contenía 110 unidades de PEG, que se unió a los grupos -SH que se muestran en la superficie de HfT. Los polímeros de PEG se modelaron en una conformación muy compactada en la superficie de la proteína, para reflejar el volumen hidrodinámico que se había medido experimentalmente para la HfT PEGilada de circulación sostenida (PEG 5 kDa) (véase Vannucci et al., 2012).

ii) Para construir un modelo de la nueva HfT, la secuencia de escisión de MMP seleccionada (SEQ ID NO: 5) se unió al extremo N expuesto de cada subunidad HfT (SEQ ID NO: 1) y se construyeron una serie de polímeros PAS de diferentes longitudes. Estos polímeros de PAS se unieron a la secuencia de escisión de MMP a través de tres restos de glicina y su volumen se comparó con el de la HfT PEGilada. Inicialmente, se seleccionaron dos longitudes PAS ya que reflejaban dos escenarios diferentes, es decir, una conformación extendida (PAS40) y una conformación más compactada (PAS75), teniendo en cuenta que, debido a la presencia de enlaces peptídicos y restos de prolina, los polímeros PAS tienen grados de libertad significativamente reducidos en comparación con un PEG altamente flexible.

El gen HfT-MMP-PAS40 se logró combinando tres secuencias diferentes en una única secuencia: HfT (SEQ ID NO: 1), MMP (SEQ ID NO: 5) y PAS (SEQ ID NO: 9). Se insertó un enlazador que constaba de tres restos de glicina entre HfT y MMP y entre MMP y PAS.

El gen HfT-MMP-PAS75 se logró combinando tres secuencias diferentes en una sola secuencia: HfT (SEQ ID NO: 1), MMP (SEQ ID NO: 5) y PAS (SEQ ID NO: 10). Se insertó un enlazador que constaba de tres restos de glicina entre HfT y MMP y entre MMP y PAS.

El vector de expresión pET-11a que contiene el gen HfT-MMP-PAS40 o el gen HfT-MMP-PAS75 se sintetizó usando GENEART AG (Alemania). La síntesis de genes se llevó a cabo teniendo en cuenta la optimización de codones para altos niveles de expresión en *Escherichia coli*.

Ejemplo 2

Expresión bacteriana y purificación de las proteínas de fusión HfT-MMP-PAS40 y HfT-MMP-PAS75

Los vectores de expresión pET-11a que contienen HfT-MMP-PAS40 o HfT-MMP-PAS75 del Ejemplo 1 se insertaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se secuenciaron por el método de secuenciación dideoxi para confirmar la presencia del gen correcto. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) que contienen el plásmido recombinante se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de 0,6 a 37 °C en 1 l de medio líquido Caldo Terrific (TB) que contiene ampicilina (23,6 g/l de extracto de levadura, 11,8 g/l de triptona, 9,4 g/l de K₂HPO₄, 2,2 g/l de KH₂PO₄). La expresión génica se indujo mediante la adición de isopropil tio-β-D-galactósido (IPTG) 0,5 mM y el cultivo se incubó adicionalmente durante 3 horas. Las células se recogieron por centrifugación (15000 rpm durante 20 minutos), se suspendieron en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), ditiotretol 0,5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 300 mM, y se rompieron por sonicación. El lisado se centrifugó a 15000 rpm durante 40 minutos y el sobrenadante que contenía la fracción soluble se trató durante 30 minutos a 37 °C con ADNasa 0,1 mg/ml enriquecida con MgCl₂ 5 mM, se calentó a 75 °C durante 10 minutos, se enfrió en hielo y luego se centrifugó para eliminar las proteínas desnaturalizadas. El sobrenadante recuperado se precipitó usando una concentración de sulfato de amonio saturado al 65 % (p/v). El sedimento se resuspendió y se dializó durante la

noche frente a Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, NaCl 0,25 M, y luego se cargó en una columna HiLoad 26/600 Superdex 200 (GE Healthcare) previamente equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las fracciones se reunieron, se concentraron, se filtraron en condiciones estériles y se almacenaron a 4 °C. La pureza de todas las preparaciones se evaluó usando tinción con azul de Coomassie de un gel de PAGE al 15 % en presencia de SDS. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar obtenido con el software ProtParam (www.expasy.org).

El perfil de expresión bacteriana para la construcción HfT-MMP-PAS75 se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 3

Preparación de una versión PEGilada de la proteína HfT

La HfT nativa se PEGiló con PEG de 5 kDa y se usó como referencia en experimentos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Las soluciones (2 mg/ml) se incubaron con metoxipolietilenglicolmaleimida 1,0 mM, 5 kDa (Sigma-Aldrich), en PBS a pH 7,0 y a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas con agitación. Posteriormente, las muestras se filtraron e intercambiaron 5 veces con H₂O_{dd} utilizando dispositivos de filtrado para centrifugado de 30 kDa Amicon Ultra-15 (Millipore Corporate) para eliminar el exceso de reactivos. La muestra PEGilada (HfT-PEG5K) se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 4

Evaluación del volumen hidrodinámico para HfT, HfT-MMP-PAS40, HfT-MMP-PAS75 y HfT-PEG5K mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Los experimentos de SEC se llevaron a cabo usando una columna Superose 6 de filtración en gel equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,5. Todas las muestras se prepararon a 1 mg/ml en PBS filtrada.

Todos los perfiles de elución SEC se analizaron con Origin 8.0 (Originlab Corporation, Northampton, MA). Los perfiles de elución para HfT y su proteína de fusión o versiones funcionalizadas se muestran en la Figura 5. Estos resultados indican que ambas versiones PASiladas tienen volúmenes hidrodinámicos que son más altos en comparación con la proteína nativa y comparables con la versión PEGilada (PEG 5 kDa) de HfT, con HfT-MMP-PAS75 ligeramente más alto y HfT-MMP-PAS40 ligeramente más bajo. Además, ambas versiones PASiladas tienen un perfil más homogéneo y monodisperso en comparación con la versión PEGilada. Estos volúmenes hidrodinámicos se consideran valores apropiados para los propósitos de los presentes inventores, y ambas proteínas de fusión HfT-MMP-PAS75 y HfT-MMP-PAS40 se caracterizaron y usaron adicionalmente para encapsular los fármacos y como nanovehículos para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 5

Eliminación del PAS protector de la proteína de fusión HfT-MMP-PAS75 en presencia de proteasas MMP2 /9 *in vitro*

Con el fin de analizar la escisión enzimática de conjugados sensibles a MMP, se estudió la escisión de HfT-MMP-PAS75 en presencia de MMP-2/9. Se mezcló una solución de HfT-MMP-PAS75 con colagenasa IV (que contenía MMP2 y 9) y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Luego, las muestras se analizaron en experimentos SEC usando una columna Superose 6 de filtración en gel equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,5 (Figura 6) y mediante cromatografía en gel SDS (Figura 7).

Ejemplo 6

Preparación de HfT-MMP-PAS40 y HfT-MMP-PAS75 que llevan un agente quimioterapéutico

Como agente quimioterapéutico, los inventores describieron un ejemplo en el que se usó el fármaco doxorubicina (DOXO). La DOXO se encapsuló dentro de la cavidad proteica de las dos proteínas de fusión aprovechando el proceso de desacoplamiento-acoplamiento de proteínas en función del pH. La reacción se realizó usando una concentración preferida de DOXO 1,5 mM y una concentración preferida de proteína de 5 µM. La reacción de encapsulación se llevó a cabo mezclando suavemente DOXO y la proteína en la oscuridad en condiciones ácidas a un pH comprendido entre 1,8 y 2,5, más preferiblemente a 2,0. La temperatura de reacción normalmente está comprendida entre + 10 °C y + 40 °C, preferiblemente + 25 °C, durante un período de tiempo de 5 a 30 minutos, preferiblemente durante 10 minutos. Posteriormente, la solución se ajustó rápidamente a un pH comprendido entre 6,5 y 9,0, más preferiblemente a pH 7,5, usando NaOH concentrado y se dejó en agitación durante 30 minutos adicionales. A continuación, la solución se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se dializó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 durante un período comprendido entre 10 y 16 horas, en la oscuridad a 4 °C. Como etapa final, la solución se ajustó a la concentración deseada con dispositivos de centrifugación de 30 kDa Amicon Ultra-15 (Millipore Corporate). Las nanopartículas (NP) de HfT que contienen

DOXO (HfT-MMP-PAS40-DOXO y HfT-MMP-PAS75-DOXO) se filtraron en condiciones estériles y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad.

Ejemplo 7

Prueba de los rendimientos de encapsulación del fármaco doxorubicina

La capacidad de encapsular doxorubicina por dos de las construcciones establecidas (HfT-MMP-PAS40 y HfT-MMP-PAS75) se probó y se comparó con la de la proteína nativa HfT y con otros datos de la bibliografía. La cantidad de doxorubicina se determinó después de que las muestras se hubieran incubado con isopropanol ácido (HCl 2 N) a 25 °C durante un período de 30 minutos. La evaluación se realizó utilizando un espectrofotómetro UV-visible con lecturas a 485 nm y un coeficiente de extinción para DOXO de $9250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Los rendimientos relativos se dieron en términos de % de recuperación de proteína y número de moléculas de doxorubicina encapsuladas (Figura 8). Se puede observar que las construcciones objeto de esta patente han adquirido sorprendentemente e inesperadamente una mejor capacidad para encapsular el fármaco doxorubicina en al menos un factor de 6 en comparación con la HfT nativa.

Ejemplo 8

Prueba de la estabilidad de los complejos de ferritina-doxorubicina

La estabilidad de los complejos de ferritina-doxorubicina se probó a 4 °C y 37 °C en términos de % de liberación del fármaco a lo largo del tiempo. El % de doxorubicina liberado se evaluó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando una columna Superose 6 de filtración en gel equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,5. Todas las muestras se prepararon a 1 mg/ml en PBS filtrada, seguido de la medición de la absorbancia a 280 y 485 nm. En la Figura 9 se muestra un perfil de elución típico para HfT-MMP-PAS40-DOXO.

Como se muestra en la Figura 10, debido a las modificaciones llevadas a cabo en la HfT descritas en esta patente, la construcción HfT-MMP-PAS40 (los mismos resultados también se obtuvieron con HfT-MMP-PAS75) es mucho más estable en su forma unida al fármaco en comparación con la construcción HfT nativa correspondiente.

Ejemplo 9

Efectos antiproliferativos de HfT-MMP-PAS75-DOXO *in vitro*

Con el fin de probar la proliferación, se sembraron células de sarcoma humano (HT-1080) en placas de 96 pocillos a aproximadamente 5×10^3 / pocillo en 200 µl de medio completo a 37 °C. Al día siguiente, los pocillos recibieron PBS, HfT-MMP-PAS75, doxorubicina o HfT-MMP-PAS75-DOXO, por triplicado, a diferentes concentraciones en doxorubicina, y las células se cultivaron durante 72 horas. Durante las últimas 4 horas en cultivo, se añadió [^3H]-timidina (1 *Ci/pocillo; 1 mCi = 37 MBq), y la incorporación se evaluó lisando las células lavadas y contando la radiactividad precipitable por TCA.

[0048] Los efectos antiproliferativos de HfT-MMP-PAS75-DOXO para las células cancerosas cultivadas se muestran en la Figura 11. Los resultados indican que HfT-MMP-PAS75-DOXO inhibe eficazmente las células de sarcoma cultivadas *in vitro* de una manera dependiente de la concentración, con IC₅₀ valores idénticos o incluso más bajos en comparación con la doxorubicina desnuda. Estos resultados son de gran importancia a la luz de las posibles aplicaciones terapéuticas.

Ejemplo 10

Experimentos farmacocinéticos sobre compuestos que contienen doxorubicina

Con el fin de evaluar la estabilidad del plasma y la farmacocinética, los compuestos que contienen doxorubicina se inyectaron por vía intravenosa en ratones sanos. Luego, se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos (10, 60, 180, 360 y 1440 minutos), se diluyeron 1:10 con isopropanol ácido (0.75 N HCl) y se congelaron a -20 °C. Al día siguiente, la doxorubicina extraída se cuantificó midiendo la fluorescencia a una excitación de 485 nm y una emisión de 590 nm, utilizando un lector de placa de exploración multimodo. Se evaluaron las siguientes muestras: doxorubicina, INNO-206 (una formulación de doxorubicina nueva y más activa), HfT-DOXO, HfT-MMP-PAS40-DOXO y HfT-MMP-PAS75-DOXO. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Ejemplo 11

Evaluación del efecto terapéutico de los compuestos que contienen doxorubicina en modelos animales

Un experimento típico para evaluar el efecto terapéutico de los compuestos que contienen doxorubicina se llevó a cabo en ratones que portaban un tumor pancreático humano (xenoinjertos). Se trataron grupos de ratones (n = 6), una vez que los tamaños del tumor alcanzaron aproximadamente 100 mm³, 4 veces (cada 4 días) con una dosis de

5 mg/kg de doxorrubicina. Los compuestos probados fueron: INNO-206, HFt-MMP-PAS40-DOXO y HFt-MMP-PAS75-DOXO. El resultado de un experimento típico para el peso tumoral (e imágenes representativas) después de aproximadamente 3 semanas desde el comienzo del tratamiento se describe en la Figura 13. Como se muestra en la figura, las construcciones que contienen doxorrubicina establecidas por los presentes inventores tienen una mayor eficacia terapéutica actividad en comparación con la nueva formulación del fármaco doxorrubicina (INNO-206) a las dosis probadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

10	<110> Consiglio Nazionale delle Ricerche
	<120> Una proteína de fusión, una nanopartícula compuesta por una pluralidad de monómeros de dicha proteína de fusión y usos de la misma
15	<130> I0160220-EC
	<160> 10
	<170> PatentIn versión 3.5
20	<210> 1
	<211> 183
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
25	<400> 1

ES 2 665 218 T3

Met	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Ser	Gln	Val	Arg	Gln	Asn	Tyr	His	Gln	Asp	1	5	10	15
Ser	Glu	Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Gln	Ile	Asn	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ala	Ser	20	25	30	
Tyr	Val	Tyr	Leu	Ser	Met	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Ala	35	40	45	
Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	His	Gln	Ser	His	Glu	Glu	Arg	50	55	60	
Glu	His	Ala	Glu	Lys	Leu	Met	Lys	Leu	Gln	Asn	Gln	Arg	Gly	Gly	Arg	65	70	75	80
Ile	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Pro	Asp	Cys	Asp	Asp	Trp	Glu	Ser	85	90	95	
Gly	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Ala	Leu	His	Leu	Glu	Lys	Asn	Val	Asn	100	105	110	
Gln	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	His	Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys	Asn	Asp	Pro	115	120	125	
His	Leu	Cys	Asp	Phe	Ile	Glu	Thr	His	Tyr	Leu	Asn	Glu	Gln	Val	Lys	130	135	140	
Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Asp	His	Val	Thr	Asn	Leu	Arg	Lys	Met	Gly	145	150	155	160
Ala	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Lys	His	Thr	Leu	165	170	175	
Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser																180			

<210> 2
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Variante de la cadena pesada de la ferritina humana (vHFt)

<400> 2

ES 2 665 218 T3

Met	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Ser	Gln	Val	Arg	Gln	Asn	Tyr	His	Gln	Asp
1				5					10					15	
Ser	Glu	Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Gln	Ile	Asn	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ala	Ser
			20					25					30		
Tyr	Val	Tyr	Leu	Ser	Met	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Ala
		35					40					45			
Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	His	Gln	Ser	His	Glu	Lys	Arg
	50					55					60				
Glu	Gly	Ala	Glu	Lys	Leu	Met	Lys	Leu	Gln	Asn	Gln	Arg	Gly	Gly	Arg
65					70					75					80
Ile	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Pro	Asp	Cys	Asp	Asp	Trp	Glu	Ser
				85					90					95	
Gly	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Ala	Leu	His	Leu	Glu	Lys	Asn	Val	Asn
			100					105					110		
Gln	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	His	Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys	Asn	Asp	Pro
		115					120					125			
His	Leu	Cys	Asp	Phe	Ile	Glu	Thr	His	Tyr	Leu	Asn	Glu	Gln	Val	Lys
	130					135					140				
Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Asp	His	Val	Thr	Asn	Leu	Arg	Lys	Met	Gly
145					150					155					160
Ala	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Lys	His	Thr	Leu
				165					170					175	
Gly	Asp	Ser	Asp	Asn	Glu	Ser									
			180												

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido que imita un sitio de escisión de una MMP

<400> 3

Gly	Pro	Leu	Gly	Ile	Ala	Gly	Gln
1				5			

5	<210> 4 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Péptido que imita un sitio de escisión de una MMP <400> 4 Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln 1 5
15	<210> 5 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Péptido que imita un sitio de escisión de una MMP <400> 5 Pro Leu Gly Leu Ala Gly 1 5
25	<210> 6 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Péptido que imita un sitio de escisión de una MMP <400> 6 Pro Val Gly Leu Ile Gly 1 5
35	<210> 7 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Péptido que imita un sitio de escisión de una MMP
45	<400> 7 Cys Gly Leu Asp Asp 1 5
50	<210> 8 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> Péptido con sitios de escisión de una MMP repetidos <400> 8 Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln 1 5 10 15
60	

ES 2 665 218 T3

<210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 <400> 9
 10
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 20 25 30
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 35 40
 <210> 10
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 20
 <400> 10
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 20 25 30
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 35 40 45
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 50 55 60
 Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala
 65 70 75
 25

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende al menos tres dominios, en la que:
 - 5 (a) un primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la ferritina humana nativa o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la ferritina humana nativa;
 - (b) un segundo dominio comprende la secuencia de aminoácidos de un sitio de escisión de una metaloproteinasa de matriz (MMP); y
 - 10 (c) un tercer dominio N-terminal que consiste en un polipéptido no estructurado de al menos 20 restos de aminoácidos que consisten en prolina, serina y alanina (PAS).
2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el PAS tiene una longitud que es inferior a 80 restos de aminoácidos, preferiblemente está comprendido por entre 20 y 80 restos de aminoácidos, más
 15 preferiblemente está comprendido por entre 40 y 75 restos de aminoácidos.
3. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la ferritina humana nativa de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos de la variante de la cadena pesada de la ferritina humana de SEQ ID NO: 2.
 20
4. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el segundo dominio comprende la secuencia de aminoácidos de un sitio de escisión de una metaloproteinasa de matriz (MMP) seleccionado del grupo que consiste en MMP-2, MMP-3, MMP-7 y MMP-9.
- 25 5. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la metaloproteinasa de matriz (MMP) se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3-8.
6. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los restos de prolina del polipéptido PAS antes mencionado representan el 10-40 % del total de restos de aminoácidos del mismo.
 30
7. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido PAS se selecciona de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
8. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una primera y/o segunda secuencia(s) de aminoácidos de enlazador que unen, respectivamente, el primer dominio con el
 35 segundo dominio y/o el segundo dominio con el tercer dominio, en el que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos son iguales o diferentes entre sí.
9. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está unida a un principio activo y/o agente para diagnóstico por imagen.
 40
10. Una nanopartícula que comprende una pluralidad de monómeros de una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, preferiblemente 24 monómeros.
- 45 11. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.
- 50 13. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o el vector de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 10, un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 11, un vector de acuerdo con la reivindicación 12 o una célula hospedadora de acuerdo con la
 55 reivindicación 13, en combinación con al menos un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso como un medicamento.
- 60 16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento terapéutico y/o diagnóstico de un tumor.

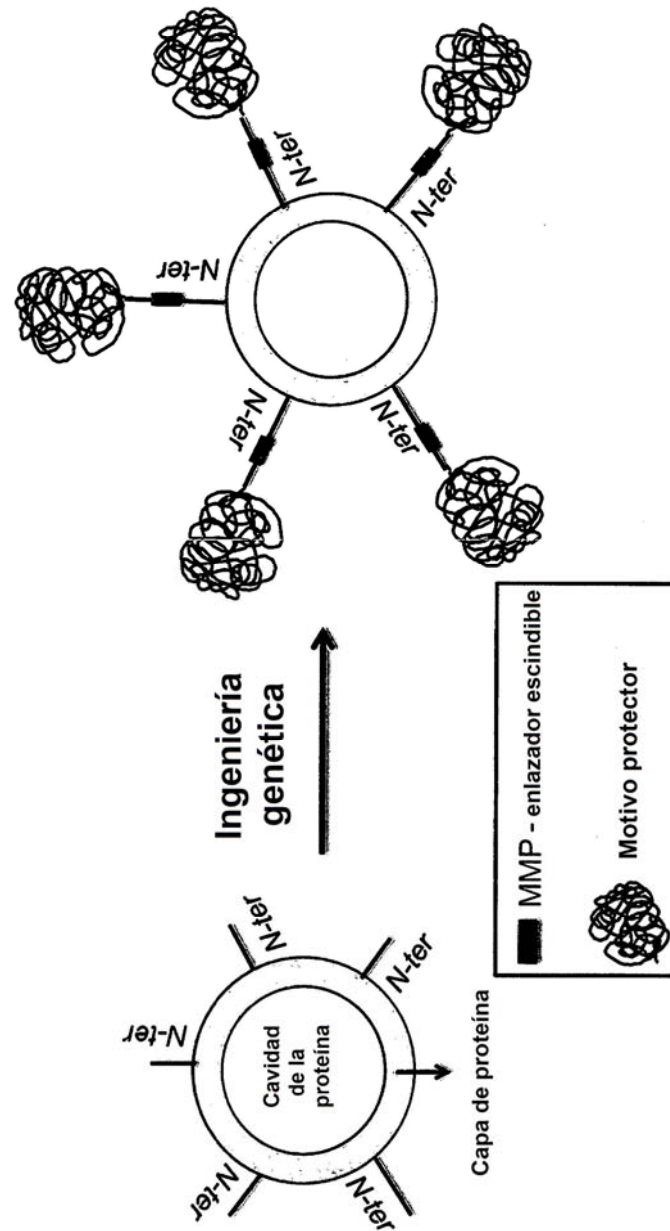


Fig.1

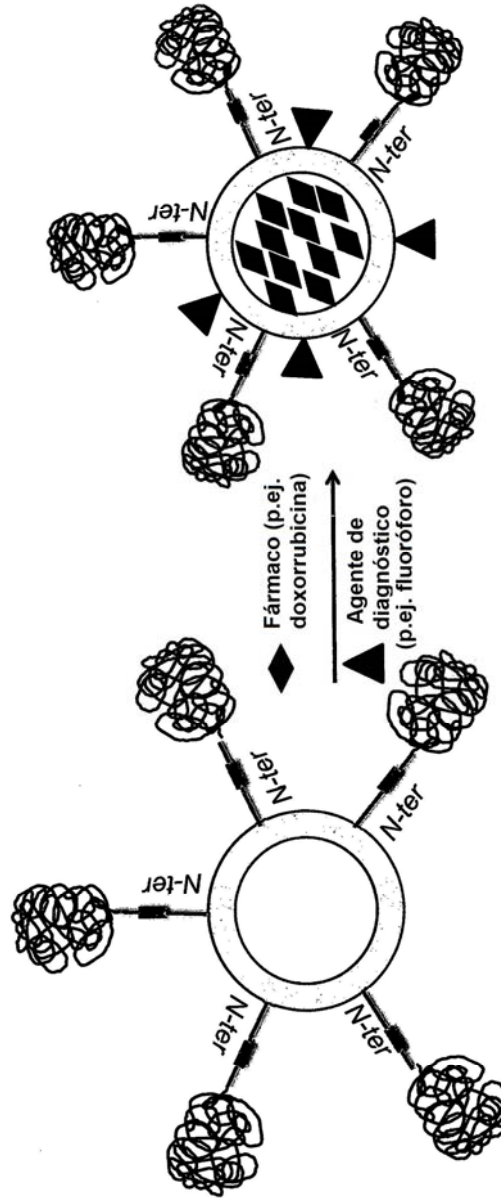


Fig. 2

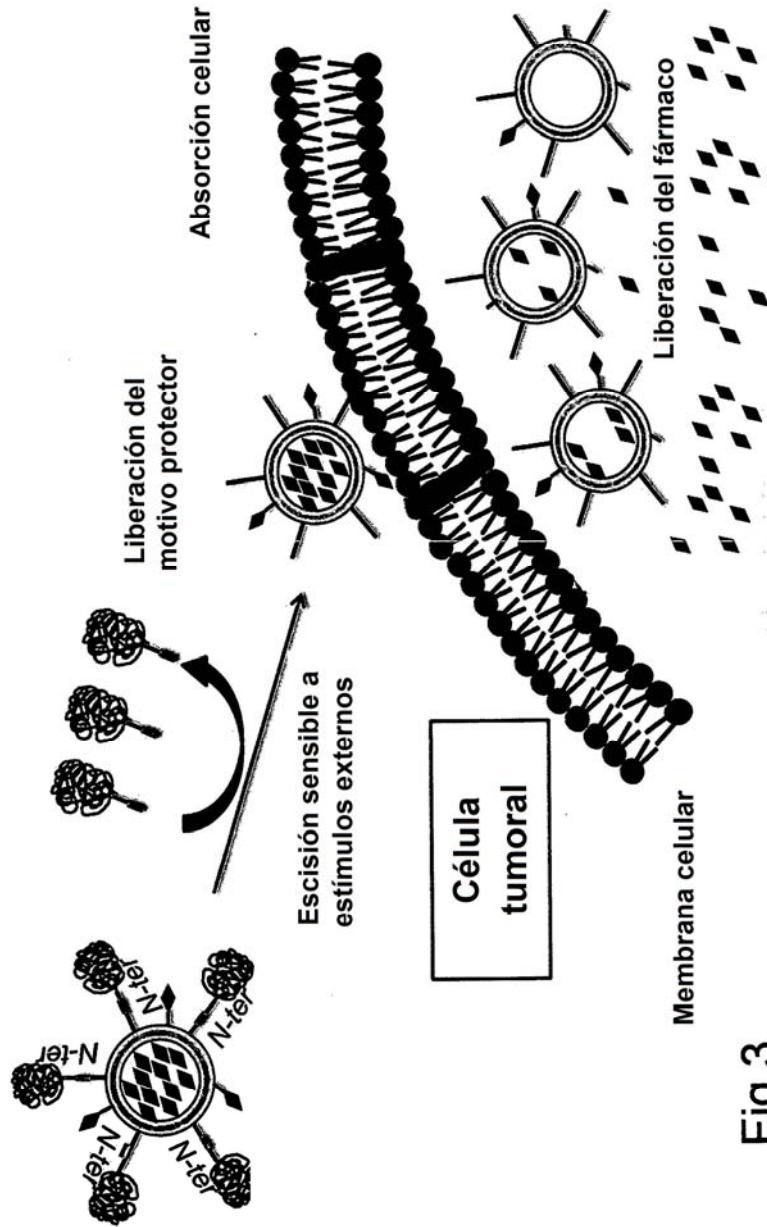


Fig.3

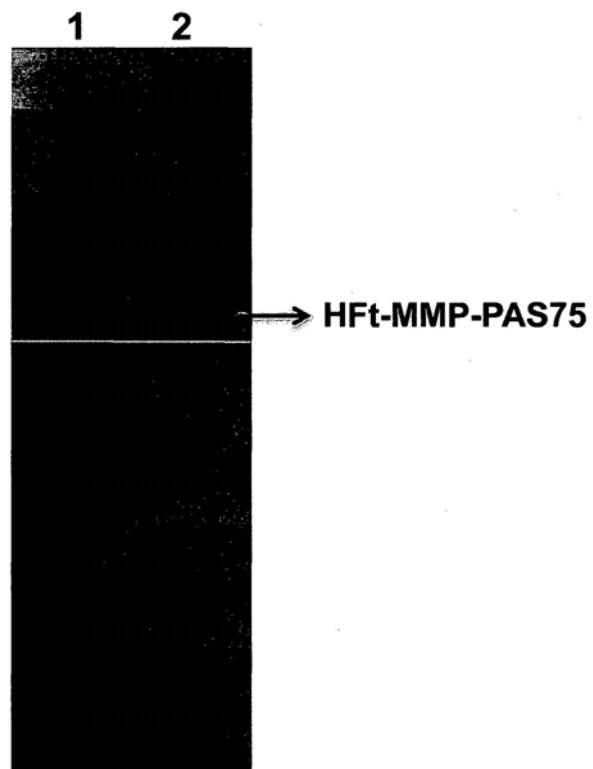


Fig. 4

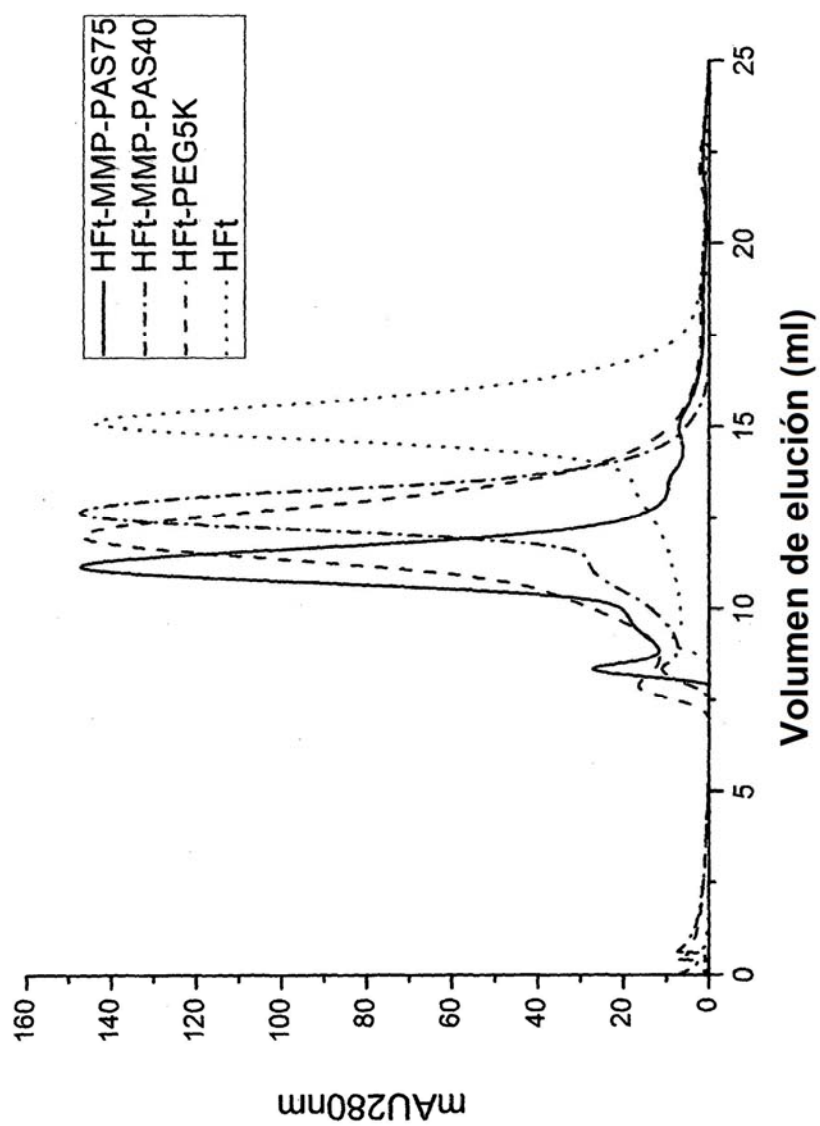


Fig. 5

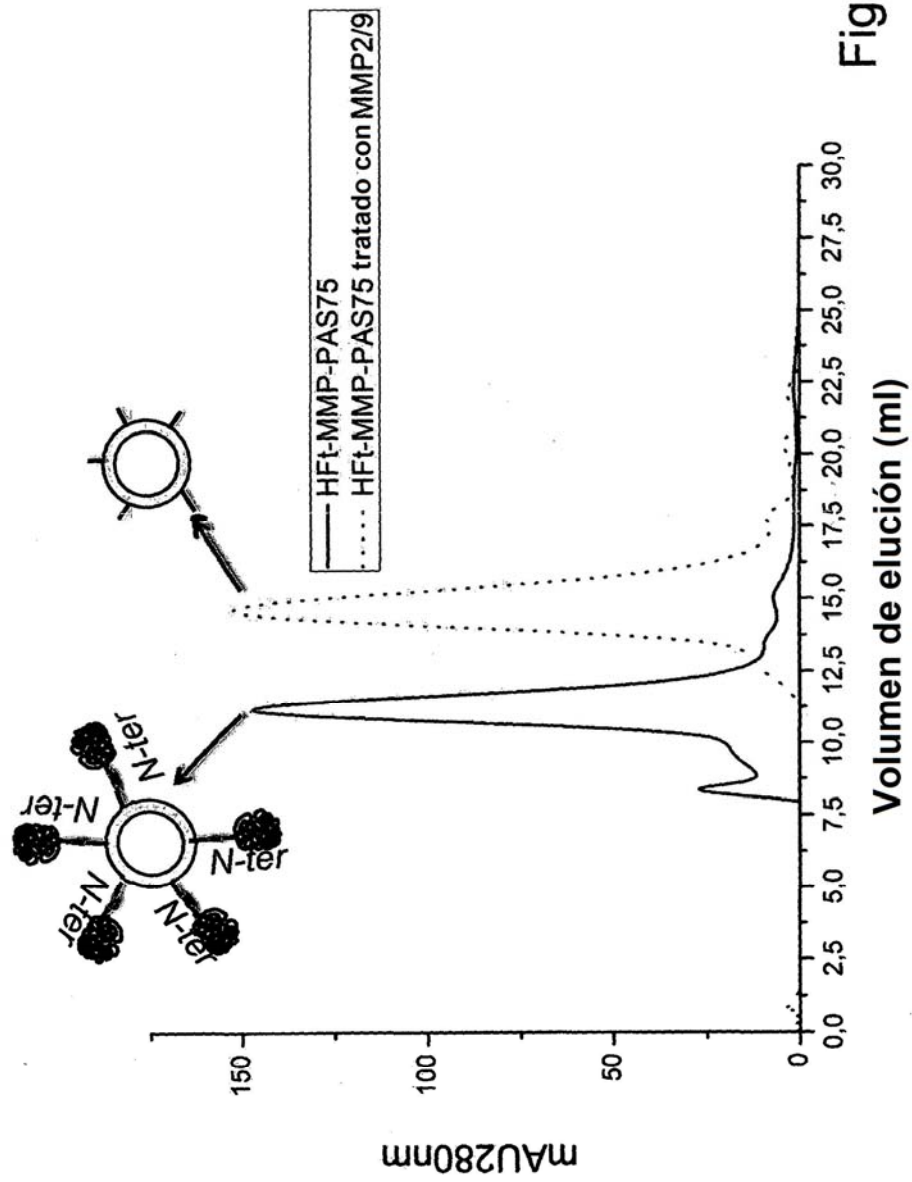


Fig. 6

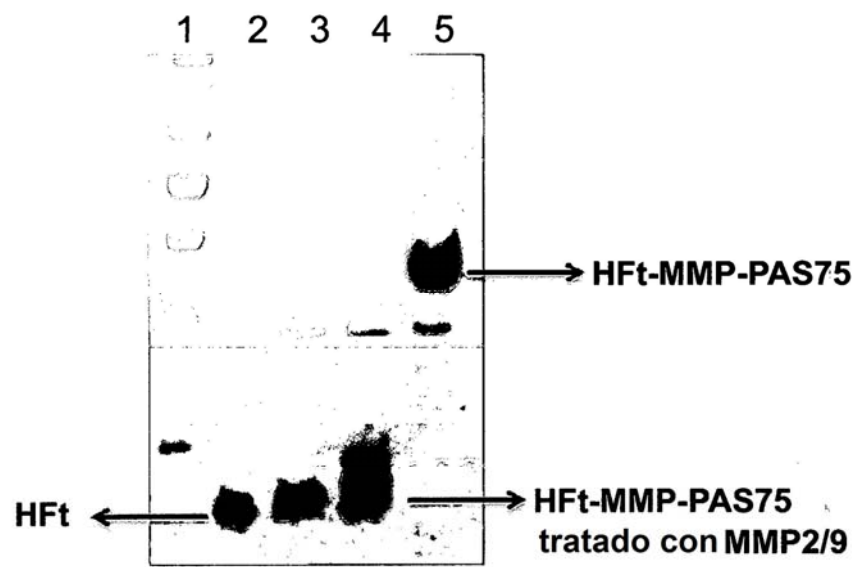


Fig. 7

Proteína	Recuperación de proteína (%)	Número de moléculas de doxorrubicina encapsuladas
HfT-MMP-PAS75	96±4	94±4
HfT-MMP-PAS40	95±3	90±3
HfT humana nativa	40±4	29±3
HfT humana nativa ¹	53,33	11
HfT humana nativa ²	n.d.	33
HfT equina nativa ³	48±9	23±3

1. Zhen Z et al., ACS Nano. 2013 Jun 25;7(6):4830-7
2. Liang M et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Oct 14;111(41):14900-5
3. Kilic MA et al., J Biomed Nanotechnol. 2012 Jun;8(3):508-14

Fig. 8

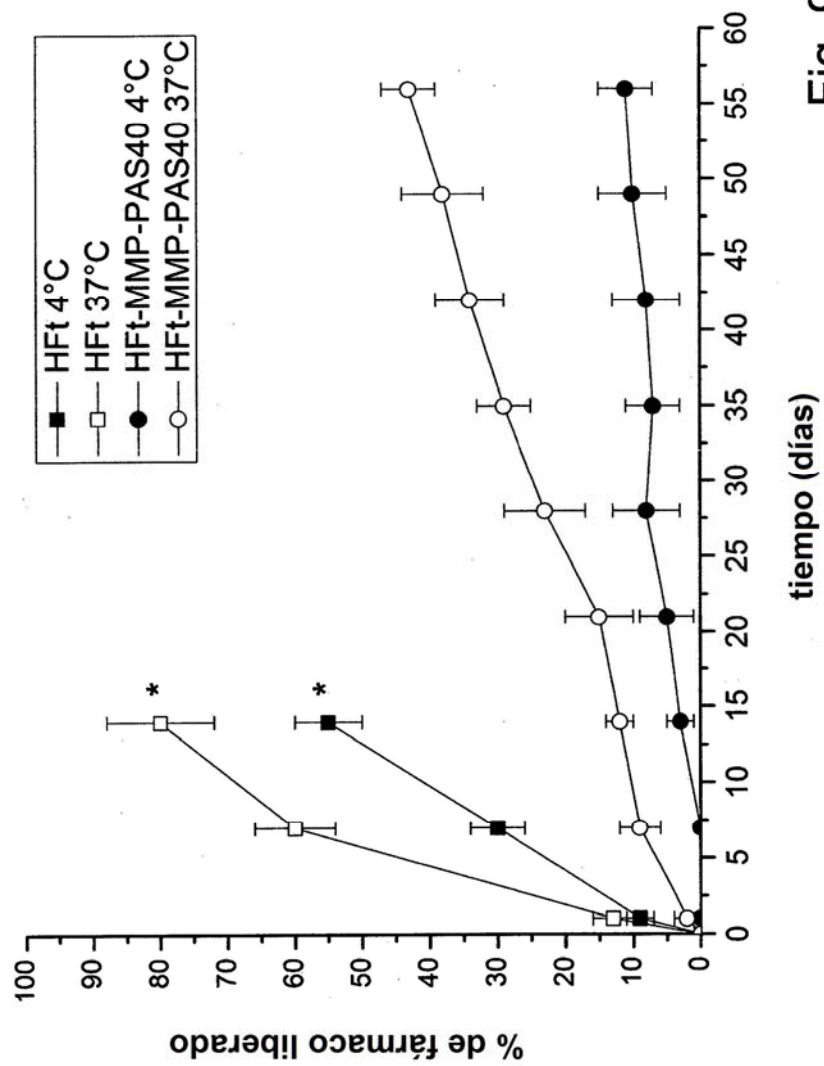


Fig. 9

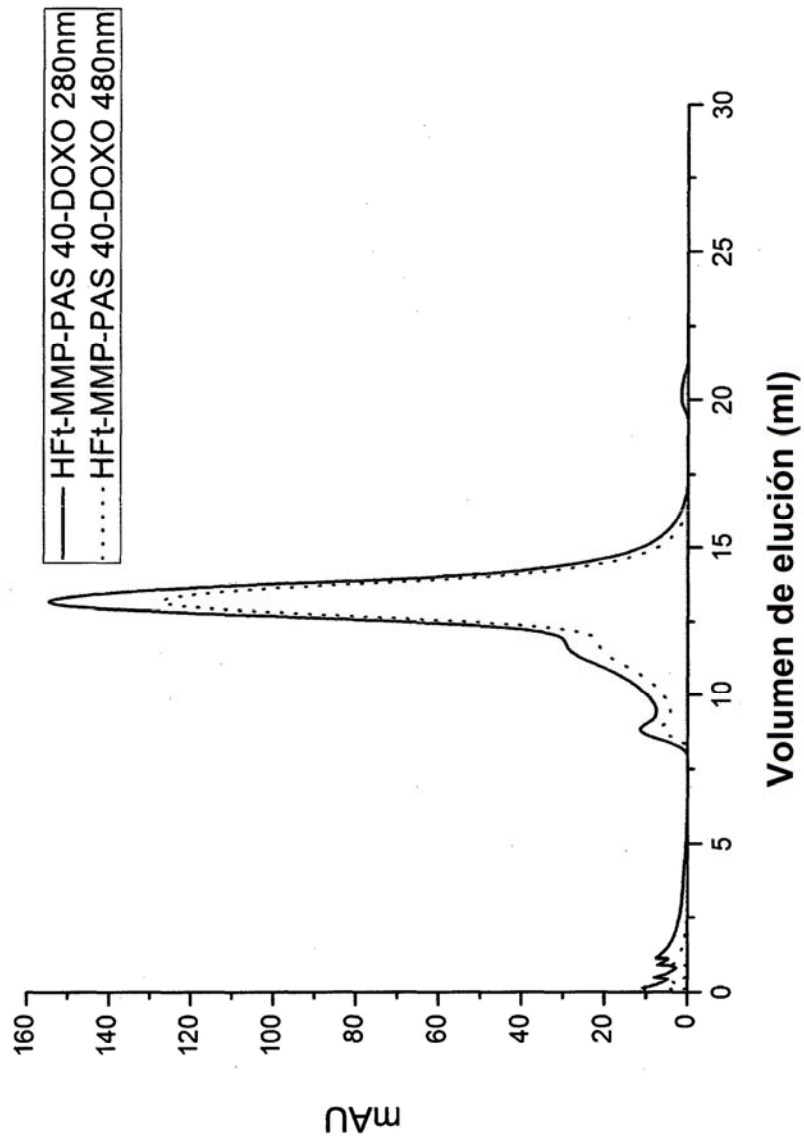


Fig. 10

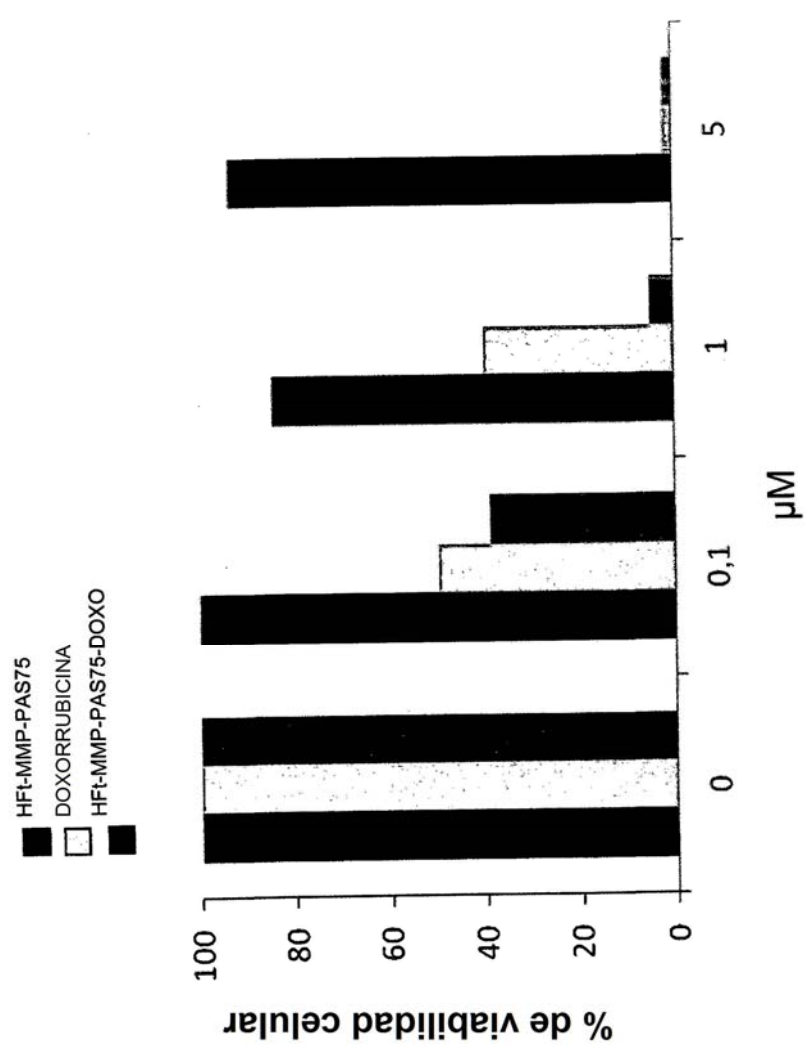


Fig. 11

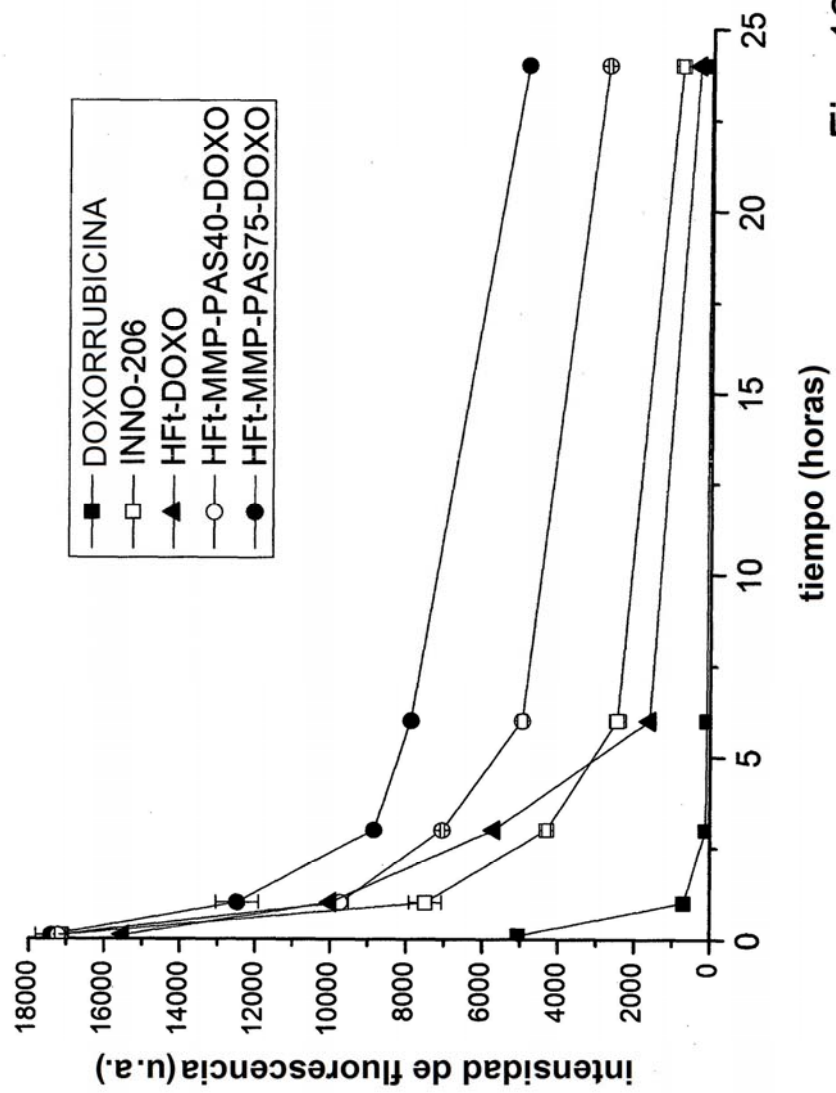
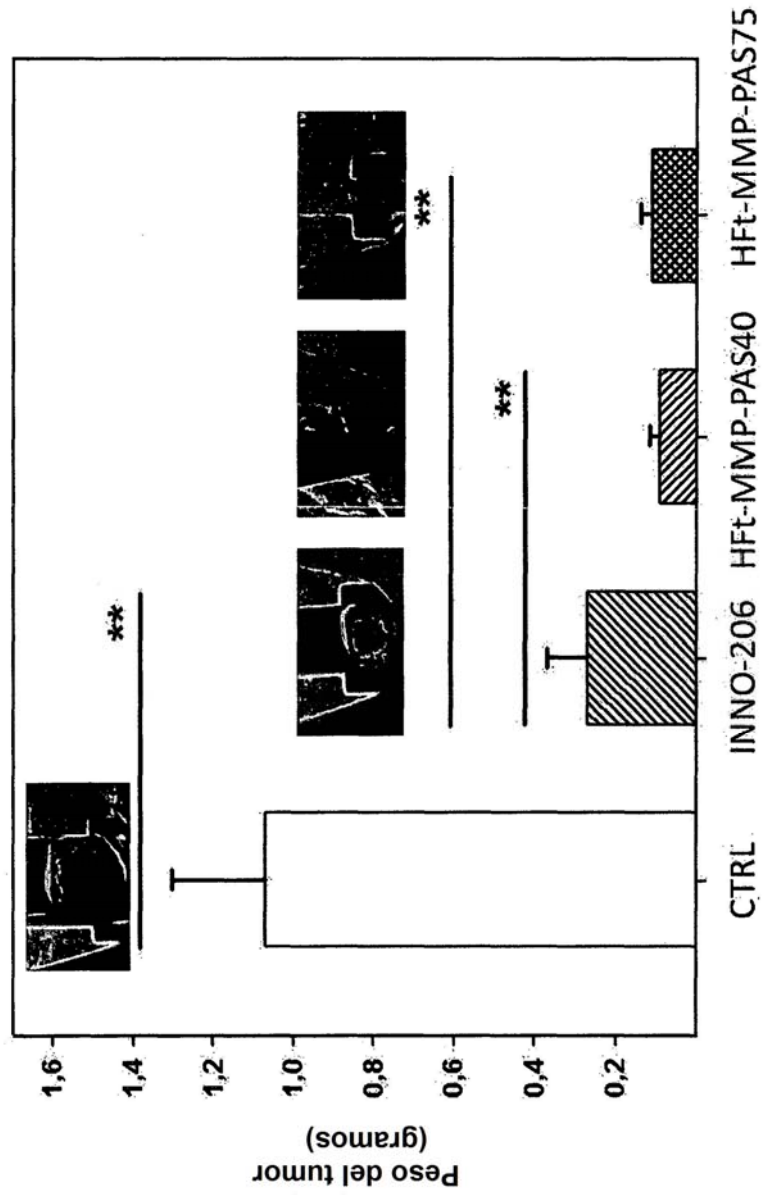


Fig. 12



** p<0,01

Fig. 13