(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 694 574**

(51) Int. CI.:

A61P 31/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 5/10 (2006.01)
C07K 5/11 (2006.01)
C07K 5/107 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61K 47/66 (2007.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2004 E 16188609 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3167935**

(54) Título: **Método y complejos portadores para suministrar moléculas a células**

(30) Prioridad:

01.05.2003 US 467516 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2018

(73) Titular/es:

CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. (100.0%)
395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US

(72) Inventor/es:

SZETO, HAZEL;
ZHAO, KESHENG;
BIRK, ALEX V. y
ROBERTSON, HUGH D.

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Método y complejos portadores para suministrar moléculas a células

Antecedentes de la invención

Las células biológicas son generalmente altamente selectivas en cuanto a las moléculas que se les permite pasar a través de la membrana celular. Por tanto, el suministro de compuestos, tales como moléculas pequeñas y moléculas biológicas al interior de una célula está habitualmente limitado por las propiedades físicas del compuesto. Las moléculas pequeñas y moléculas biológicas pueden, por ejemplo, ser compuestos farmacéuticamente activos.

La ausencia de suministro de dichas moléculas, incluyendo macromoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, en células *in vivo,* ha sido un obstáculo para el uso terapéutico, profiláctico y/o diagnóstico de una gran cantidad de compuestos potencialmente eficaces. Además, muchos compuestos que parecen prometedores *in vitro,* se han descartado como fármacos potenciales debido a la ausencia de capacidad de suministrar el compuesto de forma eficaz dentro de una célula, *in vivo.*

Varios informes han abordado el problema de suministrar compuestos a células uniendo covalentemente los compuestos a "dominios de transducción de proteínas" (PTD). Schwarze et al. (Trends Pharmacol Sci. 2000; 21:45-8) y la patente de Estados Unidos Nº 6.221.355 de Dowdy describen varios PTD que pueden cruzar la bicapa lipídica de las células de un modo dependiente de la concentración. Los PTD descritos incluyen PTD derivados de la proteína tat de VIH-1, de un factor de transcripción homeótico de Drosophila codificado por el gen antenna-pedia (abreviado ANTP), y de un factor de transcripción VP22 del virus del herpes simple. El PTD de tat de VIH-1 es de once aminoácidos de longitud, El PTD de ANTP es dieciséis aminoácidos de longitud, y el PTD de VP22 es de 34 aminoácidos de longitud.

Recientes publicaciones, sin embargo, indican que estos PTD entran en las células mediante endocitosis dependiente de energía. Por lo tanto, los complejos "PTD-carga" están contenidos dentro de las vesículas endosómicas de la célula y no disponibles para, por ejemplo, el citoplasma de la célula. Por consiguiente, los complejos "PTD-carga" deben liberarse de las vesículas endosómicas para ser bioactivos (Richard et al., J Biol. Chem. 2003; 278: 585-590; Drin et al., J Biol. Chem. 2003; 278: 31192-31201). Además, existen informes recientes de que estos PTD son tóxicos para las células.

Por tanto, existe la necesidad de péptidos que sean capaces de cruzar la membrana lipídica de las células de un modo no endocitótico e independiente de energía. Además, para evitar las respuestas inmunes, habitualmente conocidas para péptidos grandes, existe la necesidad de péptidos más pequeños, resistentes a peptidasa. Finalmente, es importante que los vehículos peptídicos sean no tóxicos para las células.

Sumario de la invención

Estas necesidades se han cumplido mediante la presente invención. Específicamente, la presente invención proporciona un complejo portador que comprende: (i) un agente citotóxico o un poliaminoácido; y (ii) un péptido catiónico aromático, en el que el péptido catiónico aromático es: (a) Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (DALDA); o (b) 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Dmt^1-DALDA); o (c) Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Phe^1-DALDA); o (d) D-Arg-2',6'Dmt-Lys-Phe-NH_2; o (e) 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Dmp^1-DALDA).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un complejo portador de la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéutico.

Además, la presente invención proporciona un complejo portador de la presente invención para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal.

Además también, la presente invención proporciona un método para suministrar un agente citotóxico o un poliaminoácido a una célula *in vitro,* comprendiendo el método poner en contacto la célula *in vitro* con un complejo portador de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Captación de péptido en células Caco-2. Curso de tiempo de captación de [^{3}H] [Dmt^1]DALDA (A) y [^{14}C]Gly-Sar (B). Las células Caco-2 se incubaron con [^{3}H][Dmt^1]DALDA (250 nM, 47 Ci/mmol) o [^{14}C]Gly-Sar (50 μM, 56,7 mCi/mmol) durante 1 h a 37 o 4ºC. Posteriormente se determinó la radiactividad en células solubilizadas. (C) Efectos de lavado con ácido sobre la acumulación de [^{3}H][Dmt^1]DALDA. Las células Caco-2 se incubaron con [^{3}H][Dmt^1]DALDA durante 1 h a 37ºC. Antes de la lisis celular, las células se sometieron a lavado con ácido para retirar la radiactividad asociada a superficie celular. (D) Efecto de la concentración de [Dmt^1]DALDA sobre la captación de [Dmt^1]DALDA. Las células se incubaron con un intervalo de concentraciones de [Dmt^1]DALDA (1 μM-3 mM) durante 1 h a 37ºC. Todos los datos se presentan como la media ± E.T. de tres

monocapas independientes. Donde no son evidentes barras de error, son más pequeñas que el símbolo.

Figura 2. Efecto del pH y DEPC sobre la captación de [^{3}H][Dmt^1]DAL-DA (A y C) y [^{14}C]Gly-Sar (B y D) en células Caco-2. Las células Caco-2 se incubaron con [^{3}H][Dmt^1]DALDA (250 nM, 47 Ci/mmol) o [^{14}C]Gly-Sar (50 μM, 56,7 mCi/mmol) durante 1 h a 37ºC en diversas condiciones de pH (A y B). Las células se preincubaron a 24ºC con DEPC 0,2 mM durante 10 min. antes de la incubación con [^{3}H][Dmt^1]DALDA (250 nM, 47 Ci/mmol) o [^{14}C]Gly-Sar (50 μM, 56,7 mCi/mmol) a 37ºC durante 1 h (C y D). Todos los datos se presentan como la media ± E.T. de tres monocapas independientes.

Figura 3. (A) Captación de [^{3}H][Dmt^1]DALDA en diferentes líneas celulares. Las células se incubaron con [^{3}H][Dmt^1]DAL-DA (250 nM, 47 Ci/mmol) durante 1 h a 37ºC. Antes de la lisis celular, las células se sometieron a lavado con ácido para retirar la radiactividad asociada a superficie celular. Los datos mostrados representan radiactividad resistente a ácido y se presentan como la media ± E.T. para tres monocapas independientes. (B) Unión específica de [^{3}H][Dmt^1]DALDA a membranas celulares. Se incubaron membranas preparadas a partir de células SH-SY5Y y células Caco-2 con [^{3}H][Dmt^1]DALDA (15-960 pM) durante 1 h a 25ºC. La unión no específica se evaluó por inclusión de [Dmt^1]DALDA no marcado 1 μM. El radioligando libre se separó del radioligando unido por filtración rápida. No se observó unión específica con células Caco-2. Para células SH-SY5Y, el valor de K_d fue 118 pM (intervalo 87-149) y el valor de B_{max} fue 96 fmol/mg de proteína.

Figura 4. (A) Flujo saliente de [^{3}H][Dmt^1]DALDA (columna rellena) y [^{14}C]Gly-Sar (columna abierta). Las células Caco-2 se precargaron con [^{3}H][Dmt^1]DALDA (250 nM, 47 Ci/mmol) o [^{14}C]Gly-Sar (50 μM, 56,7 mCi/mmol) durante 1 h a 37 o 4ºC. Las células después se lavaron e incubaron con medio de cultivo durante 1 h a 37 o 4ºC. Se determinó la radiactividad tanto en medio como en lisado celular, y los datos se presentan como el porcentaje de péptido que ha fluido al medio. (B) Efecto de DEPC sobre el flujo saliente de [^{3}H][Dmt^1]DALDA. Las células se preincubaron con DEPC 0,2 mM durante 10 min. a 25ºC antes de cargarlas con [^{3}H][Dmt^1]DALDA. (C) Efecto de verapamilo, un inhibidor de *p*-glucoproteína, sobre el flujo saliente (C) y captación (D) de [^{3}H][Dmt^1]DALDA.

Figura 5. Transporte de [^{3}H][Dmt^1]DALDA y [^{14}C]Gly-Sar a través de una monocapa Caco-2. Las células Caco-2 (2×10^5) se sembraron en membrana microporosa dentro de cámaras de cultivo celular Transwell. Se determinó el transporte apical-a-basolateral de los péptidos añadiendo [^{3}H][Dmt^1]DALDA o [^{14}C]Gly-Sar al compartimiento apical, y se retiraron alícuotas de 20 μl de los compartimientos tanto apicales como basolaterales en diversos momentos después de la adición de péptido para la determinación de la radiactividad.

Figura 6. Captación celular de [Dmt^1,dnsDap^4]DALDA y [Dmt^1, atnDap^4]DALDA. Las células Caco-2 se incubaron con [Dmt^1,dnsDap^4]DALDA 0,1 μM durante 15 min. a 37ºC. Las células después se lavaron y cubrieron con PBS. Se realizó microscopía en 10 min. a temperatura ambiente. Se realizó excitación a 340 nm y se midió la emisión a 520 nm. La fluorescencia apareció difusa en todo el citoplasma pero se excluyó completamente del núcleo. La ausencia de concentración vesicular a 37ºC sugiere captación no endocitótica.

Figura 7. Confirmación espectrométrica de masas del acoplamiento de tres péptidos al enlazador cruzado SMCC. Se disolvieron SMCC (1 μg) y péptido (5 μg) juntos en 2 ml de PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., y se almacenaron a 4ºC. Se mezcló una alícuota de muestra con matriz (ácido 3-hidroxi picolínico (HPA) saturado en acetonitrilo al 50%, 10 mg/ml de citrato de amonio) en una proporción 1:10, y se aplicaron puntualmente sobre una placa diana de acero inoxidable. Las muestras se analizaron por espectrometría de masas por desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Los pesos moleculares de los péptidos y sus respectivos conjugados SM-CC se indican en los espectros.

Figura 8. Capacidad de péptidos de potenciar la captación de β-galactosidasa (β-Gal) en células de neuroblastoma N_2A. Las células (células de neuroblastoma N_2A o Caco-2) se sembraron en placas de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) y se incubaron con β-Gal o β-Gal conjugada con péptido (mediante SMCC) durante 1 h a 37ºC. Las células después se lavaron 4 veces con tampón fosfato. Las células después se tiñeron con conjunto de tinción con β-gal (Roche) durante al menos 2 h a 37ºC y se examinaron bajo el microscopio. (A) No se observó captación de β-Gal cuando se incubaron células Caco-2 con β-Gal. (B) La presencia de células azules indica la captación de β-Gal conjugada con [Dmt^1]DALDA en células Caco-2. (C) Captación potenciada de β-Gal conjugada con [D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2] en células Caco-2. (D) Captación potenciada de β-Gal conjugada con [Phe^1]DALDA en células Caco-2. La conjugación de β-Gal con SMCC solo no potenció la captación.

Figura 9. La co-incubación con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC potencia la captación de proteína verde fluorescente (GFP) en células Huh7. Las células Huh7 (1×10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 0,5 ml de DMEM que contenía 3 μg GFP sola (A), 3 μg de GFP y 40 μl de [Dmt^1]DALDA (B), o 3 μg de GFP y 40 μl de [Dmt^1]DALDA conjugado con SMCC (C) durante 60 min. a 37ºC. Después se añadieron 2 ml de medio celular a las células y se incubaron durante 24 horas adicionales en incubadora de células. Después de la incubación, las células se lavaron cuatro veces en medio celular y se visualizó la GFP retenida en células vivas por microscopía de barrido láser confocal. Se realizó excitación a 340 nm y se midió la emisión a 520 nm. El panel superior representa imágenes de GFP a través de una sección óptica horizontal central de 0,8 μm de

grosor de células Huh7. El panel inferior representa imágenes de contraste de interacción diferencial en el mismo campo.

Figura 10. Conjugación de [Dmt^1] DALDA con un oligo ARN. El oligo ARN sintético (40 nucleótidos de longitud) se fosforiló en el extremo 5' usando γ-^{32}P-ATP y polinucleótido quinasa. El producto se purificó por electroforesis en gel. Se conjugaron 500.000 cpm de oligo ARN purificado en gel con [Dmt^1] DALDA en presencia de 1 mg de EDC (N-[3-dimetilaminopropil-N'-etilcarboiimida]). El producto de la reacción de conjugación ([Dmt^1] DALDA-oligo ARN) y el oligo ARN solo se analizaron en gel de poliacrilamida al 15% urea.

Figura 11. Captación de conjugado [Dmt^1]DALDA - [^{32}P]oligo ARN en células Caco-2. Las células Caco-2 (1 x 10^6) se lavaron tres veces en medio DMEM y se pre-incubaron en DMEM durante 5 minutos. Las células después se incubaron con conjugado [Dmt^1]DALDA-[^{32}P]oligo ARN o ARN de control (aproximadamente 20.000 cpm) durante 60 minutos a 37ºC. Después de la incubación, las células se lavaron, lisaron, y se determinó la radiactividad en el lisado celular. La captación de conjugado [Dmt^1]DALDA-[^{32}P]ARN fue >3 veces mayor en comparación con ARN solo.

Figura 12. Efecto de conjugados péptido-SMCC para potenciar la captación de oligo ARN en células Huh7. (A) Efecto del tiempo sobre la captación celular de oligo ARN. Las células Huh7 (1x106 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 1,0 ml de DMEM que contenía [^{32}P]oligo ARN (monocatenario, 11 bases; ~100.000 cpm) solo o con 40 ml de conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC durante 15 ó 60 min. a 37ºC. Las células después se lavaron cuatro veces en DMEM y una vez en solución de acetato sódico para retirar la unión no específica antes de incubar en tampón de lisis durante 30 min. y se determinó la radiactividad retenida. La co-incubación de oligo ARN con [Dmt^1]DALDA-SMCC a 37ºC aumentó la captación del oligo ARN en 10 veces después de 15 min. de incubación, y 20 veces después de 60 min. de incubación. (B) Efecto de la temperatura sobre la captación celular de oligo ARN. La capacidad de [Dmt^1]DALDA-SMCC de potenciar la capacidad de captar ARN fue menor a 4ºC, aunque aún era captación aumentada en 10 veces. (C) Captación celular potenciada de ARN por diferentes conjugados péptido-SMCC. Las células Huh7 (1x10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 1,0 ml de DMEM que contenía [^{32}P]oligo ARN solo o con 40 ml de conjugado péptido-SMCC durante 15 minutos a 37ºC. Los tres conjugados péptido-SMCC aumentaron la captación de ARN.

Figura 13. La co-incubación con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC potenció la captación de dos ARN de diferentes longitudes. Se conjugó [Dmt^1]DALDA con SMCC y se confirmó por espectroscopía de masas. Se mezclaron un oligo ARN de 11 monómeros y un ARN de 1350 monómeros con el conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC durante 15 min. a temperatura ambiente. Las células Huh7 (1 x 10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 1 ml de DMEM que contenía ARN solo (~100.000 cpm), o el ARN mezclado con el conjugado [Dmt^1]DALDA-SM-CC durante 60 min. a 37ºC y CO_2 al 5%. Las células después se lavaron cuatro veces en DMEM y una vez en solución de acetato sódico para retirar la unión no específica. Las células lavadas después se incubaron en tampón de lisis durante 30 min. y se contó la radiactividad retenida. En comparación con incubación con ARN solo, la co-incubación con el conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC aumentó la captación del ARN de 11 monómeros en 22 veces, y la captación del ARN de 1350 monómeros en 3 veces.

Figura 14. Conjugación de oligo ADN con [Dmt^1]DAL-DA. Se disolvieron SMCC (1 μg) y [Dmt^1]DALDA (5 μg) juntos en 2 ml de PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., y se mezclaron con oligo ADN 3'-tiol desprotegido a 4ºC durante 24 horas. Después de incubación, se mezcló una alícuota de muestra con matriz (ácido 3-hidroxi picolínico (HPA) saturado en acetonitrilo al 50%, 10 mg/ml de citrato de amonio) en una proporción 1:10, y se aplicó de forma puntual sobre una placa diana de acero inoxidable. Las muestras se analizaron por MALDI-TOF MS (A). Se descubrió que los pesos moleculares de oligo ADN 3'-tiol y complejo covalente [Dmt^1]DAL-DA-ADN eran 6392 y 7171, respectivamente. Los oligos tanto conjugados como no conjugados se fosforilaron en el extremo 5' usando γ-^{32}P-ATP en la reacción con polinucleótido quinasa, y los productos de la reacción con quinasa se analizaron en gel de poliacrilamida al 15% urea y se purificaron del gel para estudios de captación celular (B).

Figura 15. Captación celular de oligo ADN conjugado con [Dmt^1]DALDA. Se conjugó un ADN de 20 monómeros 3'-tiol-modificado con [Dmt^1]DALDA usando SMCC, y la formación del conjugado se confirmó por espectroscopía de masas. Se radiomarcaron los oligo ADN tanto conjugados como no conjugados en el extremo 5' con ^{32}P y se purificaron del gel. Las células neuronales N_2A (1 x 10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y se incubaron con 1 ml de DMEM que contenía oligo ADN conjugado a [Dmt^1]DAL-DA o no conjugado (~100.000 cpm) durante 2 h o 19 h a 37ºC y CO_2 al 5%. Las células después se lavaron cuatro veces en DMEM y una vez en solución de acetato sódico para retirar la unión no específica. Las células después se incubaron en tampón de lisis durante 30 min. y se determinó la radiactividad retenida. El eje Y muestra la captación de ADN representada como el porcentaje de radiactividad total.

Figura 16. [Dmt^1]DALDA es no tóxico para células en cultivo. Las células neuronales N_2A se incubaron con [Dmt^1]DALDA (1 nM a 10 μM) durante 24 h y se determinó la viabilidad celular por el ensayo MTT.

Figura 17. El conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC no induce apoptosis en células Huh7. Las células Huh7 (1 x 10^6 células/pocillo) se lavaron tres veces en DMEM, y se aplicó 1 ml de medio fresco. Después, se añadieron 50 µl de conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC (1 mM) en PBS o PBS solamente (control) al medio celular y se incubaron a 37ºC durante 24 horas en CO_2 al 5%. Después de incubación, se añadió 1 µl de colorante Hoechst para teñir los núcleos apoptóticos a las células y se incubaron durante 15 min. adicionales. El colorante Hoechst excesivo se retiró lavando las células con medio celular (libre de indicador de pH) y las células tratadas con conjugado [Dmt^1]DALDA-SM-CC se compararon con células de control usando microscopía fluorescente (excitación a 350 nm y emisión a 461 nm).

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento por los inventores de que ciertos complejos portadores, que comprenden (i) un agente citotóxico o poliaminoácido y (ii) un péptido catiónico aromático, pueden cruzar las membranas celulares mediante un mecanismo independiente de energía y suministrar las enzimas al interior de la célula.

Péptidos catiónicos aromáticos

Los péptidos catiónicos aromáticos útiles en la presente invención tienen una carga positiva neta como se describe a continuación, son solubles en agua y altamente polares.

En una realización particularmente preferida, un péptido catiónico aromático tiene la fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (por conveniencia representado por el acrónimo: DALDA). DALDA tiene una carga positiva neta de tres, a la que contribuyen los aminoácidos tirosina, arginina, y lisina y tiene dos grupos aromáticos a los que contribuyen los aminoácidos fenilalanina y tirosina. La tirosina de DALDA puede ser un derivado modificado de tirosina tal como en 2',6'-dimetiltirosina para producir el compuesto que tiene la fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (es decir, Dmt^1-DALDA).

En otra realización preferida, el aminoácido en el extremo N-terminal de DALDA puede ser una fenilalanina o su derivado. Un péptido catiónico aromático con fenilalanina en el extremo N-terminal tiene la fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (es decir, Phe^1-DALDA). También puede usarse el derivado de fenilalanina 2',6'-dimetilfenilalanina (Dmp), es decir, el péptido catiónico aromático puede tener la fórmula 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Dmp^1-DALOA).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de Dmt^1-DALDA está dispuesta de tal modo que Dmt no está en el extremo N-terminal. Un ejemplo de dicho péptido catiónico aromático tiene la fórmula D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH_2.

Moléculas

En la presente invención, el complejo portador comprende una molécula seleccionada entre un agente citotóxico o un poliaminoácido, junto con el péptido catiónico aromático.

La molécula puede ser una molécula biológica o una molécula pequeña. Preferiblemente, la molécula biológica o molécula pequeña es una molécula farmacéuticamente activa. Una molécula farmacéuticamente activa como se usa en el presente documento, es cualquier molécula que ejerza un efecto beneficioso *in vivo*.

En general, una molécula biológica es cualquier molécula que contenga una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos y tenga un peso molecular superior a 450. Dichas secuencias de ácido nucleico y aminoácido se denominan en el presente documento "polinucleótidos" y "poliaminoácidos", respectivamente.

En general, las moléculas biológicas incluyen polinucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos y poliaminoácidos, tales como péptidos, polipéptidos y proteínas. Los ejemplos de moléculas biológicas que son farmacéuticamente activas incluyen péptidos endógenos (por ejemplo, vasopresina, glutatión), proteínas (por ejemplo, interferones), hormonas (por ejemplo, hormona de crecimiento humana), enzimas (por ejemplo, α-galactosidasa), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos contra beta-amiloide, que pueden usarse para tratar la enfermedad de Alzheimer), factores de crecimiento neurotróficos (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso NGF (por sus siglas en inglés), factor neutrófico derivado del cerebro BDNF (por sus siglas en inglés)), citocinas (por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de células endoteliales vasculares VEGF (por sus siglas en inglés)) y oligonucleótidos.

La molécula puede ser una molécula pequeña. En general, las moléculas pequeñas incluyen compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos, monosacáridos, aminoácidos y nucleótidos. Las moléculas pequeñas pueden incluir adicionalmente moléculas que de otro modo se considerarían moléculas biológicas, excepto porque su peso molecular no es superior a 450. Por tanto, en general, las moléculas pequeñas pueden ser lípidos, oligosacáridos, oligopéptidos y oligonucleótidos, y sus derivados, que tengan un peso molecular de 450 o menos.

Se enfatiza que las moléculas pequeñas pueden tener cualquier peso molecular. Se denominan meramente moléculas pequeñas porque no se clasifican como moléculas biológicas y, normalmente, tienen pesos moleculares inferiores a 450. Las moléculas pequeñas incluyen compuestos que se encuentran en la naturaleza, así como compuestos sintéticos. Los ejemplos de moléculas pequeñas que son farmacéuticamente activas incluyen antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, penicilina, eritromicina), agentes citotóxicos (por ejemplo, doxorrubicina, adriamicina) y antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, vitamina C, betacaroteno).

Complejos portadores

Al menos un agente citotóxico o poliaminoácido como se ha descrito anteriormente, y al menos un péptido catiónico aromático como se ha descrito anteriormente, se asocian para formar un complejo portador. El agente citotóxico o poliaminoácido y el péptido catiónico aromático pueden asociarse mediante cualquier método conocido para los especialistas en la técnica. Los tipos adecuados de asociaciones incluyen enlaces químicos y enlaces físicos. Los enlaces químicos incluyen, por ejemplo, enlaces covalentes y enlaces coordinados. Los enlaces físicos incluyen, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares, fuerzas de van der Waal, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas y apilamiento aromático.

El tipo de asociación entre los agentes citotóxicos o poliaminoácidos y los péptidos catiónicos aromáticos típicamente depende de, por ejemplo, los grupos funcionales disponibles en el agente citotóxico o poliaminoácido y los grupos funcionales disponibles en el péptido catiónico aromático.

Para un enlace químico o enlace físico, un grupo funcional en el agente citotóxico o poliaminoácido típicamente se asocia con un grupo funcional en el péptido catiónico aromático. Como alternativa, un grupo funcional en el péptido catiónico aromático se asocia con un grupo funcional en el agente citotóxico o poliaminoácido.

Los grupos funcionales en el agente citotóxico o poliaminoácido y el péptido catiónico aromático pueden asociarse directamente. Por ejemplo; un grupo funcional (por ejemplo, un grupo sulfhidrilo) en un agente citotóxico o poliaminoácido puede asociarse con un grupo funcional (por ejemplo, grupo sulfhidrilo) en un péptido catiónico aromático para formar un disulfuro.

Como alternativa, los grupos funcionales pueden asociarse a través de un agente de entrecruzamiento (es decir, enlazador). Algunos ejemplos de agentes de entrecruzamiento se describen a continuación. El enlazador cruzado puede unirse al agente citotóxico o poliaminoácido o el péptido catiónico aromático.

El enlazador puede afectar o no a la cantidad de cargas netas del péptido catiónico aromático. Típicamente, el enlazador no contribuirá a la carga neta del péptido catiónico aromático. Cada grupo amino, si los hay, presente en el enlazador contribuirá a la carga positiva neta del péptido catiónico aromático. Cada grupo carboxilo, si los hay, presente en el enlazador contribuirá a la carga negativa neta del péptido catiónico aromático.

La cantidad de agentes citotóxicos o poliaminoácidos o péptidos catiónicos aromáticos en el complejo portador está limitada por la capacidad del péptido de acomodar múltiples agentes citotóxicos o poliaminoácidos o la capacidad del agente citotóxico o poliaminoácido de acomodar múltiples péptidos. Por ejemplo, la impedancia estérica puede impedir la capacidad del péptido de acomodar agentes citotóxicos o poliaminoácidos especialmente grandes.

La cantidad de agentes citotóxicos o poliaminoácidos o péptidos catiónicos aromáticos en el complejo portador también está limitada por la cantidad de grupos funcionales presentes en el otro. Por ejemplo, la cantidad máxima de agentes citotóxicos o poliaminoácidos asociadas con un péptido depende de la cantidad de grupos funcionales presentes en el péptido. Como alternativa, la cantidad máxima de péptidos asociados con un agente citotóxico o poliaminoácido depende de la cantidad de grupos funcionales presentes en la enzima.

En una realización, el complejo portador comprende al menos un agente citotóxico o poliaminoácido, y preferiblemente al menos dos agentes citotóxicos o poliaminoácidos, asociadas con un péptido catiónico aromático.

En otra realización, el complejo portador comprende al menos un péptido catiónico aromático, y preferiblemente al menos dos péptidos catiónicos aromáticos, asociados con un agente citotóxico o poliaminoácido. Por ejemplo, un agente citotóxico o poliaminoácido que contiene varios grupos funcionales (por ejemplo, 3, 4, 5 o más) puede asociarse con varios (por ejemplo, 3, 4 ó 5 o más) péptidos.

En otra realización más, el complejo portador comprende un péptido catiónico aromático asociado con un agente citotóxico o poliaminoácido.

En una realización, un complejo portador comprende al menos un agente citotóxico o poliaminoácido unida químicamente (por ejemplo, conjugada) con al menos un péptido catiónico aromático. El agente citotóxico o poliaminoácido puede unirse químicamente a un péptido catiónico aromático mediante cualquier método conocido para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, un grupo funcional en el agente citotóxico o poliaminoácido puede unirse directamente a un grupo funcional en el péptido catiónico aromático. Algunos ejemplos de grupos funcionales

adecuados incluyen, por ejemplo, amino, carboxilo, sulfhidrilo, maleimida, isocianato, isotiocianato e hidroxilo.

El agente citotóxico o poliaminoácido también puede unirse químicamente al péptido catiónico aromático mediante agentes reticulantes, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, y similares. Los agentes reticulantes pueden, por ejemplo, obtenerse de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL. El sitio web de Pierce Biotechnology, Inc. en la URL http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fld-ID=26436A16-60A0-4A56-85F7-213A50830440 puede proporcionar ayuda. Agentes reticulantes adicionales incluyen los agentes reticulantes de platino descritos en las patentes de Estados Unidos Nº 5.580.990; 5.985.566; y 6.133.038 de Kreatech Biotechnology, B.V., Amsterdam, Países Bajos.

El grupo funcional en el agente citotóxico o poliaminoácido puede ser diferente del grupo funcional en el péptido. Por ejemplo, si un grupo sulfhidrilo está presente en el agente citotóxico o poliaminoácido, tal como en β-galactosidasa o en oligonucleótidos de ADN y ARN modificados con tiol en el extremo 5' y/o 3', la agente citotóxico o poliaminoácido puede entrecruzarse con el péptido, por ejemplo, [Dmt^1]DALDA, a través del grupo 4-amino de lisina usando el reactivo de reticulación SMCC (es decir, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) de Pierce Biotechnology (véase el Ejemplo 10 a continuación).

Como alternativa, el grupo funcional en el agente citotóxico o poliaminoácido y el péptido pueden ser iguales. Típicamente se usan reticulantes homobifuncionales para entrecruzar grupos funcionales idénticos. Ejemplos de reticulantes homobifuncionales incluyen EGS (es decir, bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol), DSS (es decir, suberato de disuccinimidilo), DMA (es decir, adipimidato de dimetil·2 HCl), DTSSP (es decir, 3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato])), DPDPB (es decir, 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido]butano), y BMH (es decir, bis-maleimidohexano). Dichos reticulantes homobifuncionales también están disponibles en Pierce Biotechnology, Inc.

Para unir químicamente los agentes citotóxicos o poliaminoácidos y los péptidos, los agentes citotóxicos o poliaminoácidos, los péptidos, y el reticulante típicamente se mezclan juntos. El orden de adición de los agentes citotóxicos o poliaminoácidos, péptidos, y reticulante no es importante. Por ejemplo, el péptido puede mezclarse con el reticulante, seguido de la adición del agente citotóxico o poliaminoácido. Como alternativa, el agente citotóxico o poliaminoácido puede mezclarse con el reticulante, seguido de la adición del péptido. De forma óptima, los agentes citotóxicos o poliaminoácidos y los péptidos se mezclan, seguido de la adición del reticulante.

Los complejos portadores químicamente unidos suministran los agentes citotóxicos o poliaminoácidos a una célula. En algunos casos, el agente citotóxico o poliaminoácido funciona en la célula sin escindirse del péptido catiónico aromático. Por ejemplo, si el péptido catiónico aromático no bloquea el sitio catalítico del agente citotóxico o poliaminoácido, entonces no es necesaria la escisión del agente citotóxico o poliaminoácido del péptido catiónico aromático.

En otros casos, puede ser beneficioso escindir el agente citotóxico o poliaminoácido del péptido catiónico aromático. El sitio web de Pierce Biotechnology, Inc. descrito anteriormente también proporciona ayuda a un especialista en la técnica en la elección de reticulantes adecuados que pueden escindirse por, por ejemplo, enzimas en la célula. Por tanto, el agente citotóxico o poliaminoácido puede separarse del péptido catiónico aromático. Ejemplos de enlazadores escindibles incluyen SMPT (es decir, 4-succinimidiloxicarbonil-metil-a-[2-piridilditio]tolueno), Sulfo-LC-SPDP (es decir, 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo), LC-SPDP (es decir, 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo), Sulfo-LC-SPDP (es decir, 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo), SPDP (es decir, 3-[2-piridilditio]-propionamidohexanoato de N-succinimidilo), y AEDP (es decir, ácido 3-[(2-aminoetil)ditio]propiónico·HCl).

En otra realización, un complejo portador comprende al menos un agente citotóxico o poliaminoácido unida de forma física con al menos un péptido catiónico aromático. Puede emplearse cualquier método conocido para los especialistas en la técnica para unir de forma física los agentes citotóxicos o poliaminoácidos con los péptidos catiónicos aromáticos.

Por ejemplo, los péptidos catiónicos aromáticos y los agentes citotóxicos o poliaminoácidos pueden mezclarse juntos por cualquier método conocido para los especialistas en la técnica. El orden de mezcla no es importante. Por ejemplo, los agentes citotóxicos o poliaminoácidos pueden mezclarse físicamente con péptidos catiónicos aromáticos modificados o no modificados por cualquier método conocido para los especialistas en la técnica. Como alternativa, los péptidos catiónicos aromáticos modificados o no modificados pueden mezclarse físicamente con los agentes citotóxicos o poliaminoácidos por cualquier método conocido para los especialistas en la técnica.

Por ejemplo, los péptidos catiónicos aromáticos y agentes citotóxicos o poliaminoácidos pueden colocarse en un recipiente y agitarse, por, por ejemplo, agitación del recipiente, para mezclar los péptidos catiónicos aromáticos y los agentes citotóxicos o poliaminoácidos.

Los péptidos catiónicos aromáticos pueden modificarse por cualquier método conocido para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, el péptido catiónico aromático puede modificarse mediante agentes de reticulación o grupos

funcionales, como se ha descrito anteriormente. El enlazador puede afectar o no a la cantidad de cargas netas del péptido catiónico aromático. Típicamente, el enlazador no contribuirá a la carga neta del péptido catiónico aromático. Cada grupo amino, su los hay, presente en el enlazador contribuye a la carga positiva neta del péptido catiónico aromático. Cada grupo carboxilo, si los hay, presente en el enlazador contribuye a la carga negativa neta del péptido catiónico aromático.

Por ejemplo, [Dmt^1]DALDA puede modificarse, a través del grupo 4-amino de lisina usando el reactivo de reticulación SMCC (es decir, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) de Pierce Biotechnology (véase el Ejemplo 10 a continuación). Para formar un complejo portador, el péptido catiónico aromático modificado habitualmente se forma primero y después se mezcla con el agente citotóxico o poliaminoácido.

Una ventaja de los complejos portadores físicamente unidos, es que el agente citotóxico o poliaminoácido funciona en una célula sin la necesidad de retirar un péptido catiónico aromático, tal como los complejos portadores en que el agente citotóxico o poliaminoácido está unida químicamente a un péptido catiónico aromático. Además, si el péptido catiónico aromático no bloquea el sitio catalítico del agente citotóxico o poliaminoácido, entonces no es necesaria la disociación del complejo.

Síntesis de los péptidos catiónicos aromáticos

Los péptidos útiles en los métodos de la presente invención pueden sintetizarse químicamente por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para sintetizar la proteína incluyen, por ejemplo, los descritos por Stuart y Young en "Solid Phase Peptide Synthesis," Segunda Edición, Pierce Chemical Company (1984), y en "Solid Phase Peptide Synthesis," Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, Nueva York (1997).

Modos de administración

En una realización, la invención se refiere a un método para suministrar un agente citotóxico o poliaminoácido a una célula. El método comprende poner en contacto una célula con un agente citotóxico o poliaminoácido y un péptido catiónico aromático. La célula puede ponerse en contacto con el agente citotóxico o poliaminoácido y el péptido catiónico aromático mediante cualquier método conocido para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, una célula puede incubarse con el agente citotóxico o poliaminoácido y el péptido catiónico aromático *in vitro.* En un aspecto, el agente citotóxico o poliaminoácido y el péptido catiónico aromático pueden estar presentes en forma de un complejo portador, tal como los complejos portadores descritos anteriormente, que comprenden agentes citotóxicos o poliaminoácidos y péptidos catiónicos aromáticos unidos químicamente o unidos físicamente.

En otra realización, el método para suministrar un agente citotóxico o poliaminoácido a una célula comprende poner en contacto la célula con un complejo portador. El agente citotóxico o poliaminoácido se suministra a la célula poniendo en contacto la célula con el complejo portador que comprende el agente citotóxico o poliaminoácido y un péptido catiónico aromático. La célula puede ponerse en contacto con el complejo portador mediante cualquier método conocido para los especialistas en la técnica.

Por ejemplo, una célula puede incubarse con el complejo portador *in vitro.* La célula puede ser cualquier célula. La célula puede ser de origen vegetal, animal, o bacteriano. Un ejemplo de una célula vegetal incluye células de Arabidopsis. Ejemplos de células bacterianas incluyen *Saccharomyces* y *Lactobacillus.* Las células animales incluyen células de mamífero, tales como células neuronales, células epiteliales renales, células de riñón, células endoteliales vasculares, células de la glía, células epiteliales intestinales y hepatocitos. Un ejemplo de una célula endotelial vascular es una célula endotelial de la barrera hematoencefálica.

El complejo portador también puede administrarse a un mamífero *in vivo.* Una cantidad eficaz de un complejo portador, preferiblemente en una composición farmacéutica, puede administrarse a un mamífero que lo necesite por cualquiera de varios métodos bien conocidos para administrar compuestos farmacéuticos.

El complejo portador puede administrarse de forma sistémica o local. En una realización, el complejo portador se administra por vía intravenosa. Por ejemplo, el complejo portador puede administrarse mediante inyección rápida de bolo intravenoso. Preferiblemente, sin embargo, el complejo portador se administra como una infusión intravenosa a velocidad constante.

Los complejos portadores pueden administrarse a los tejidos de un mamífero de forma local, por ejemplo, por inyección en tejidos que están accesibles mediante una jeringa. Por ejemplo, si el complejo portador contiene un agente citotóxico que tiene que suministrarse a un tumor en un mamífero, preferiblemente, el tumor es accesible para administración local. Dichos tumores incluyen, por ejemplo, cáncer de piel y cáncer de mama.

El complejo portador también puede administrarse por vía oral, tópica, intranasal, intramuscular, subcutánea, o transdérmica. En una realización preferida, la administración transdérmica del complejo portador es por iontoforesis, en que el complejo portador se suministra a través de la piel por una corriente eléctrica.

Otras vías de administración incluyen intracerebroventricular o intratecal. Intracerebroventicular se refiere a administración en el sistema ventricular del cerebro. Intratecal se refiere a administración en el espacio por debajo de la membrana aracnoidea del cerebro o médula espinal. Por tanto, puede preferirse administración intracerebroventricular o intratecal para aquellas enfermedades y afecciones que afectan a los órganos o tejidos del sistema nervioso central.

El complejo portador puede administrarse a mamíferos por liberación sostenida, como se sabe en la técnica. La administración de liberación sostenida es un método de suministro de fármacos para conseguir un cierto nivel del fármaco durante un periodo de tiempo particular. El nivel típicamente se mide por concentración en suero.

Cualquier formulación conocida en la técnica de la farmacia es adecuada para administración del complejo portador. Para administración oral, pueden usarse formulaciones líquidas o sólidas. Algunos ejemplos de formulaciones incluyen comprimidos, cápsulas de gelatina, píldoras, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, gomas de mascar y similares. Los péptidos pueden mezclarse con un medio (vehículo) o excipiente farmacéutico adecuado como comprenden los especialistas en la técnica. Ejemplos de vehículos y excipientes incluyen almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido láctico, ácido esteárico o sales de los mismos, incluyendo estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas y glicoles.

Para administración sistémica, intracerebroventricular, intratecal, tópica, intranasal, subcutánea, o transdérmica, las formulaciones del complejo portador pueden utilizar diluyentes, vehículos, o excipientes etc. convencionales, tal como se sabe en la técnica que pueden emplearse para suministrar el complejo portador. Por ejemplo, las formulaciones pueden comprender uno o más de los siguientes: un estabilizante, un tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico, y opcionalmente una sal y/o un agente tamponante. El complejo portador puede suministrarse en forma de una solución acuosa, o en una forma liofilizada.

El estabilizante puede ser, por ejemplo, un aminoácido, tal como por ejemplo, glicina; o un oligosacárido, tal como por ejemplo, sacarosa, tetralosa, lactosa o un dextrano. Como alternativa, el estabilizante puede ser un alcohol de azúcar, tal como por ejemplo, manitol; o una combinación de los mismos. Preferiblemente el estabilizante o combinación de estabilizantes constituye de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 10% en peso para el peso del complejo portador.

El tensioactivo es preferiblemente un tensioactivo no iónico, tal como un polisorbato. Algunos ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen Tween20, Tween80; un polietilenglicol o un polioxietileno polioxipropileno glicol, tal como Pluronic F-68 a de aproximadamente el 0,001% (p/v) a aproximadamente el 10% (p/v).

La sal o agente tamponante puede ser cualquier sal o agente tamponante, tal como por ejemplo, cloruro sódico, o fosfato de sodio/potasio, respectivamente. Preferiblemente, el agente tamponante mantiene el pH de la composición farmacéutica en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. La sal y/o agente tamponante también es útil para mantener la osmolalidad a un nivel adecuado para la administración a un ser humano o un animal. Preferiblemente la sal o agente tamponante está presente a una concentración casi isotónica de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM.

Las formulaciones del complejo portador útiles en los métodos de la presente invención pueden contener adicionalmente uno o más aditivos convencionales. Algunos ejemplos de dichos aditivos incluyen un solubilizante tal como, por ejemplo, glicerol; un antioxidante tal como por ejemplo, cloruro de benzalconio (una mezcla de compuestos de amonio cuaternario, conocidos como "quats"), alcohol bencílico, cloretona o clorobutanol; agente anestésico tal como por ejemplo un derivado de morfina; o un agente isotónico etc., tal como se ha descrito anteriormente. Como precaución adicional contra oxidación u otro tipo de deterioro, las composiciones farmacéuticas puede almacenarse en gas nitrógeno en viales sellados con tapones impermeables.

El mamífero puede ser cualquier mamífero incluyendo, por ejemplo, animales de granja, tales como ovejas, cerdos, vacas, y caballos; animales de compañía, tales como perros y gatos; animales de laboratorio, tales como ratas, ratones y conejos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Utilidad

Debido a la capacidad de los complejos portadores de cruzar las membranas celulares en un mecanismo independiente de energía, son posibles numerosas aplicaciones *in vivo* e *in vitro*.

Los complejos portadores pueden usarse, por ejemplo, *in vitro,* como herramienta de investigación. Por ejemplo, los complejos portadores pueden suministrar moléculas, tales como proteínas, a una célula de modo que pueda estudiarse el papel funcional de la molécula. Dichas enzimas incluyen, por ejemplo, proteínas de señalización celular (por ejemplo, quinasas, tales como JAK).

Otra aplicación *in vitro*, incluye, por ejemplo, el suministro de un marcador, tal como β-galactosidasa, a una célula, tal como una célula madre, célula hematopoyética, o célula embrionaria, para determinar la descendencia (linaje) de

una célula.

Otras aplicaciones *in vitro* incluyen, por ejemplo, el suministro de un anticuerpo detectable a una célula para determinar la presencia de una proteína particular en la célula.

Los complejos portadores también tienen usos terapéuticos *in vivo.*

La barrera hematoencefálica es particularmente selectiva. Por tanto, una aplicación *in vivo* incluye el suministro de moléculas a través de la barrera hematoencefálica. Dicha molécula puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo contra β-amiloide en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Uno de los problemas normales asociados a los agentes quimioterápicos es conseguir niveles adecuados dentro de una célula. Por ejemplo, el agente quimioterápico puede ser demasiado grande o el agente puede no ser lo suficientemente aromático para atravesar la membrana celular. Por tanto, otra aplicación *in vivo* incluye el suministro de agentes citotóxicos a una célula.

Ejemplos

(Los Ejemplos 1-10 y 13-18 son solo para referencia)

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Fármacos y agentes químicos. [Dmt^1]DALDA y [^{3}H][Dmt^1]DALDA (47 Ci/mmol) se sintetizaron de acuerdo con métodos descritos previamente (Schiller et al., Eur. J. Med. Chem. 2000, 35: 895-901; Zhao et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002, 302: 188-196). [^{14}C]Gly-Sar (56,7 mCi/mmol) y [^{3}H][D-Ala^2,*N* Me-Phe^4;Gly^5-ol]-encefalina (50 Ci/mmol) se adquirieron de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Todos los demás fármacos y agentes químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cultivo celular. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA), y los suministros de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las células Caco-2 se cultivaron en MEM, mientras que las células SH-SY5Y, HEK293 y Huh7 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco. Los medios de cultivo se suplementaron con suero bovino fetal al 10%, 200 μg/ml de penicilina, y 100 μg/ml de sulfato de estreptomicina. Las células CRFK se cultivaron en MEM + suero de caballo al 10%, aminoácidos no esenciales, y penicilina/estreptomicina. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37ºC en una atmósfera humidificada del 95% de aire y 5% de CO_2.

Ensayo para captación de péptido. La internalización de péptido se estudió principalmente usando células Caco-2 y posteriormente se confirmó con células SH-SY5Y, HEK293, y CRFK. Se cultivaron monocapas de células en placas de 12 pocillos (5 x 10^5 células/pocillo) recubiertas con colágeno durante 3 días. En el día 4, las células se lavaron dos veces con HBSS precalentado, y después se incubaron con 0,2 ml de HBSS que contenía [^{3}H][Dmt^1]DALDA 250 nM o [^{14}C]Gly-Sar 50 μM a 37ºC durante varios tiempos hasta 1 h. En un experimento diferente, las células se incubaron con la misma concentración de [^{3}H][Dmt^1]DALDA en presencia de [Dmt^1]DALDA no marcado (1 μM-3 mM) durante 1 h a 37ºC. Para estudios de captación a 4ºC, las células se pusieron en hielo durante 20 min. antes de la incubación con [^{3}H][Dmt^1]DALDA o [^{14}C]Gly-Sar. Al final del periodo de incubación, las células se lavaron cuatro veces con HBSS, y se añadieron 0,2 ml de NaOH 0,1 N con SDS al 1% a cada pocillos. Los contenidos celulares después se transfirieron a viales de centelleo y se contó la radiactividad. Se usó una alícuota de lisado celular para la determinación del contenido de proteínas usando el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Para distinguir entre radiactividad internalizada de la radiactividad asociada a superficie, se incluyó una etapa de lavado con ácido. Antes de la lisis celular, las células se incubaron con 0,2 ml de ácido acético 0,2 M/NaCl 0,05 M durante 5 min. en hielo.

Ensayo para flujo saliente de péptido de células CaCo-2. Se cultivaron monocapas de células Caco-2 en placas de 12 pocillos (5 x 10^5 células/pocillo) durante 3 días. En el día 4, las células se precargaron con [^{3}H][Dmt^1]DALDA o [^{14}C]Gly-Sar durante 1 h a 37ºC. Las células después se lavaron cuatro veces con 1 ml de solución de incubación enfriada en hielo para terminar la captación y después se incubaron con 0,5 ml de MEM durante 1 h a 37 o 4ºC para medir el flujo saliente de péptido desde las células al medio de incubación. Se determinó la cantidad de radiactividad en lisados celulares y en el medio de incubación. Para examinar el papel de P-glucoproteína sobre la captación de péptido y flujo saliente desde las células, también se determinó la captación y flujo saliente de [Dmt^1]DALDA en presencia de verapamilo 100 μM (inhibidor de P-glucoproteína).

Ensayo para translocación de péptido a través de monocapas de Caco-2. Se prepararon monocapas de células Caco-2 como se ha descrito previamente (Irie et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001, 298: 711-717). Las células Caco-2 (2 x 10^5) se sembraron en filtros de membrana microporosa (24 mm, 0,4 μm) dentro de cámaras de cultivo celular Transwell (Corning Glassworks, Corning, NY). Cada cámara Transwell se llenó con 1,5 ml de medio en el compartimiento apical y 2,5 ml en el compartimiento basolateral. Se dio a las monocapas celulares medio fresco

cada 1 a 2 días y se usaron en el día 28 para experimentos de transporte. Se determinó el transporte apical-a-basolateral de los péptidos añadiendo [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA 0,2 μM o [^{14}C]Gly-Sar 100 μM al compartimiento apical, y se retiraron 5 alícuotas de 0- μl tanto del compartimiento apical como basolateral en diversos momentos después de la adición de péptido para la determinación de los recuentos de radiactividad.

El coeficiente de permeabilidad aparente se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: $P_{app} = X/(t \cdot A \cdot Co)$, donde *X/t* es la tasa de captación en el compartimiento receptor, A es el área de difusión (4,72 cm^{2}), y Co es la concentración inicial en el compartimiento donante.

Microscopía de barrido láser confocal. La captación de péptidos catiónicos aromáticos en células se confirmó por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) usando dos péptidos fluorescentes, [Dmt^{1},dnsDap^{4}]DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-dnsDap-NH$_2$, donde dnsDap es (ácido β-dansil-1-α,β-diamino-propiónico) y [Dmt^{1} ,atnDap^{4}]DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-atnDap-NH$_2$, donde atn es ácido β-antraniloil-L-α,β-diaminopropiónico). Se cultivaron células Caco-2 o SH-SY5Y como se ha descrito anteriormente y se sembraron en placas de fondo de vidrio (35-mm) (MatTek, Ashland, MA) durante 2 días. El medio después se retiró, y las células se incubaron con 1 ml de HBSS que contenía 0,1 μM del péptido fluorescente a 4ºC o 37ºC durante 15 min. Las células después se lavaron tres veces con HBSS enfriado en hielo y se cubrieron con 200 μl de PBS, y se realizó microscopía en 10 min. a temperatura ambiente usando un microscopio de barrido láser confocal con un objetivo C-Apochromat 63x/1,2W corr (Nikon, Tokio, Japón). Las longitudes de onda de excitación/emisión se establecieron a 340/520 nm para [Dmt^{1} ,dnsDap^{4}]DALDA y 320/420 nm para [Dmt^{1},atnDap^{4}]DALDA, respectivamente. Para el seccionado óptico en dirección z, se hicieron de 5 a 10 marcos con 2,0 μm.

Ensayo de unión de radioligando usando membranas celulares. Se determinó la unión específica de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA a receptores de superficie celular usando membranas preparadas a partir de células Caco-2 y SH-SY5Y. Después de 4 días de cultivo, las células se lavaron dos veces con tampón PBS y después se retiraron por raspado. Las células se centrifugaron a 500 g durante 5 min. y el sedimento se almacenó a -80ºC. Las células se homogeneizaron en tampón Tris-HCl 50 mM enfriado en hielo (5 μg/ml de leupeptina, 2 μg/ml de quimostatina, 10 μg/ml bestatina, y EGTA 1 mM, pH 7,4). El homogeneizado se centrifugó a 36.000 g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron con tampón Tris-HCl 50 mM. Se incubaron alícuotas de los homogeneizados de membrana (~140 μg de proteína) con [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA (15-960 pM) durante 60 min. a 25ºC. Se evaluó la unión no específica por inclusión de [Dmt^{1}]DALDA no marcado 1 μM. El radioligando libre se separó del radioligando unido por filtración rápida a través de filtros GF/B (Whatman, Maidstone, RU) con un recolector celular (Brandel Inc., Gaithersburg, MD). Los filtros se lavaron tres veces con 10 ml de tampón Tris, y la radiactividad se determinó por recuento de centelleo líquido. Las afinidades de unión (K_d) y número de receptor (B_{max}) se determinaron usando regresión no lineal (Software GraphPad, San Diego, CA).

Conjugación de proteína a [Dmt^{1}]DALDA. [Dmt^{1}]DALDA se retículo con β-galactosidasa (E. coli recombinante, Sigma-Aldrich) usando un reticulante SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) (Pierce). SMCC reacciona con moléculas que contienen amina (Lys^{4} de [Dmt^{1}]DALDA) para formar enlaces amida estables. Su extremo maleimida entonces puede conjugarse con un compuesto que contiene sulfhidrilo para crear un enlace tioéter (Bioconjugate Techniques de Greg T. Hermanson, Academic Press, página 234-237). β-Gal contiene abundantes grupos sulfhidrilo libres en su estado nativo. La captación de β-Gal proporciona una lectura conveniente con el uso de X-gal. En resumen, se mezcló 1 ml de [Dmt^{1}]DALDA 5 x 10^{-3}M con 1 mg de SMCC en tampón fosfato durante 1 h a temperatura ambiente. Esto debe producir "péptido activado". El "péptido activado" se diluyó 1:10 con tampón fosfato. Se añadió 1 mg de β-Gal a 1 ml del "péptido activado" 1:10 y se mezcló a 4ºC durante 2 h o durante una noche.

Acoplamiento de [Dmt^{1}]DALDA al reticulante SMCC y confirmación por espectrometría de masas. Se disolvieron SM-CC (1 μg) y [Dmt^{1}]DALDA (5 μg) juntos en 2 ml de PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., y se almacenaron a 4ºC. Se mezcló una alícuota de la muestra con matriz (ácido 3-hidroxi picolínico (HPA) saturado en acetonitrilo al 50%, 10 mg/ml de citrato de amonio) en una proporción 1:10, y se aplicaron puntualmente sobe una placa diana de acero inoxidable. Las muestras se analizaron por espectrometría de masas por desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) (Applied Biosystems (Voyager DE Pro)) en el modo Reflectron positivo.

Conjugación de ARN a [Dmt^{1}]DALDA y confirmación por electroforesis en gel. Se fosforiló oligo ARN sintético (40 nucleótidos de longitud) en el extremo 5' usando γ-^{32}P-ATP y polinucleótido quinasa. El producto se purificó por electroforesis en gel. Se conjugaron 500.000 cpm de oligo ARN purificado en gel con [Dmt^{1}] DALDA en presencia de 1 mg de EDC (N-[3-dimetilaminopropil-N'-etilcarboiimida]). El producto de la reacción de conjugación ([Dmt^{1}] DALDA-oligo ARN) y oligo ARN solo se analizaron en gel de poliacrilamida al 15% urea.

Conjugación de ADN con [Dmt^{1}]DALDA y confirmación por espectrometría de masas. Se disolvieron SMCC (1 μg) y [Dmt^{1}]DALDA (5 μg) juntos en 2 ml de PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., y se mezclaron con oligo ADN 3'-tiol desprotegido a 4ºC durante 24 horas. Después de incubación, se mezcló una alícuota de muestra con matriz (ácido 3-hidroxi picolínico (HPA) saturado en acetonitrilo al 50%, 10 mg/ml de citrato

de amonio) en una proporción 1:10, y se aplicó de forma puntual sobre una placa diana de acero inoxidable. Las muestras se analizaron por MALDI-TOF MS.

Formación de complejo portador por mezcla física de ARN y conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC. El conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC se preparó como se ha descrito anteriormente. Las moléculas de ARN se mezclaron con el conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC en PBS durante 15 min. a temperatura ambiente antes de su uso en estudios de captación celular.

Formación de complejo portador por mezcla física de proteína y conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC. El conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC se preparó como se ha descrito anteriormente. Las moléculas de proteína (es decir, proteína verde fluorescente, GFP) se mezclaron con el conjugado [Dmt^1]DAL-DA-SMCC durante 15 min. a temperatura ambiente antes de su uso en estudios de captación celular.

Ensayo para captación de conjugado [Dmt^1]DALDA-ARN en células. Se fosforilaron oligo ARN sintéticos en el extremo 5' usando γ-^{32}P-ATP y polinucleótido quinasa, y los productos se purificaron por electroforesis en gel. Se conjugaron 500.000 cpm de oligo ARN purificado en gel con [Dmt^1] DALDA en presencia de 1 mg de N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarboiimida, EDC). Las células Caco-2 (1 x 10^6) se lavaron tres veces en medio DMEM y se pre-incubaron en DMEM durante 5 minutos. Las células después se incubaron con conjugado [Dmt^1]DALDA-[^{32}P]oligo ARN o ARN no conjugado (aproximadamente 20.000 cpm) durante 60 minutos a 37ºC. Después de incubación, las células se lavaron tres veces en DMEM, se incubaron con tampón de lisis, y se determinó la radiactividad en el lisado celular.

Ensayo para captación de ARN en células cuando se mezclan con conjugado [Dmt^1]DALDA-reticulante. Las células Huh7 (1x10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 1,0 ml de DMEM que contenía [^{32}P]oligo ARN solo o con 40 μl de conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC, durante 60 min. a 37ºC o 4ºC. Las células después se lavaron cuatro veces en DMEM y una vez en solución de acetato sódico para reducir la unión no específica antes de incubar en tampón de lisis durante 30 min. y se determinó la radiactividad en el lisado celular.

Ensayo para captación de conjugado [Dmt^1]DALDA-proteína en células. Las células (células de neuroblastoma N_2A o Caco-2) se sembraron en placas de 96 pocillos (2 x 10^4 células/pocillo) y se incubaron con [Dmt^1]DALDA reticulado con β-Gal o β-Gal sola durante 1 h a 37ºC. Las células después se lavaron 4 veces con PBS. Las células después se tiñeron con conjunto de tinción con β-gal (Roche) durante al menos 2 h a 37ºC y se examinaron bajo el microscopio.

Ensayo para captación de proteína en células cuando se co-incuban con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC. Las células Huh7 (1x10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 0,5 ml de DMEM que contenía 3 μg de proteína verde fluorescente (GFP) sola (A), 3 μg de GFP y 40 μl de [Dmt^1]DALDA (B), o 3 μg de GFP y 40 μl de [Dmt^1]DALDA conjugado con SMCC (C) durante 60 min. a 37ºC. Después se añadieron 2 ml de medio celular a las células que se incubaron durante 24 horas adicionales en la incubadora de cultivo celular. Después de incubación, las células se lavaron cuatro veces en medio celular y se visualizó la GFP retenida en células vivas por microscopía de barrido láser confocal. La excitación se realizó a 340 nm y se midió la emisión a 520 nm.

Ensayo para apoptosis. La apoptosis se determinó con el uso de colorante Hoechst (Molecular Probes, Eugene, OR) para teñir los núcleos apoptóticos. El colorante Hoechst se cargó a los cultivos celulares y se incubó durante 15 min. Se retiró el colorante Hoechst excesivo lavando las células con medio celular (libre de indicador de pH) y se examinaron las células usando microscopía fluorescente (excitación a 350 nm y emisión a 461 nm).

Ejemplo 2: Curso de tiempo de captación de [Dmt^1]DALDA y Gly-Sar en células Caco-2.

Cuando se incubó con células Caco-2 a 37ºC, se observó [^{3}H][Dmt^1]DALDA en lisado celular tan pronto como a los 5 min., y se consiguieron niveles estacionarios en 30 min. (Figura 1A). La cantidad total de [^{3}H][Dmt^1]DALDA recuperada en el lisado celular después de incubación de 1 h representaba aproximadamente el 1% del fármaco total. En contraste, en las mismas condiciones experimentales, [^{14}C]Gly-Sar seguía aumentando desde los 5 hasta los 45 min. (Figura 1B). Se cree que la radiactividad medida refleja los niveles de [Dmt^1]DALDA, porque se ha demostrado previamente que [Dmt^1]DALDA es resistente contra la degradación con peptidasa (Szeto et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, 298: 57-61). Para determinar si la radiactividad medida estaba asociada con membranas celulares, las células se sometieron a lavado con ácido para retirar la unión superficial. La Figura 1C muestra que el 80,8% de [^{3}H][Dmt^1]DALDA era resistente a lavado con ácido y por lo tanto se supuso que estaba dentro de la célula. Se descubrió que la captación de [Dmt^1]DALDA era dependiente de la concentración sobre un amplio intervalo de concentraciones (Figura 1D).

Ejemplo 3. Dependencia de la temperatura y efectos del pH sobre la captación de [Dmt^1]DALDA y Gly-Sar.

Cuando la incubación se realizó a 4ºC, la captación de [^{3}H][Dmt^1]DALDA fue más lenta en comparación con 37ºC,

pero alcanzó el 76,5% en 45 min. (Figura 1A) y el 86,3% en 1 h (Figura 1A). En contraste, la captación de [^{14}C]Gly-Sar estaba completamente suprimida a 4ºC (Figura 1B). Se sabe que la captación de Gly-Sar por PEPT1 es dependiente de pH, sucediendo la captación óptima a pH 6,0 (Terada et al., 1999, Am. J. Physiol. 276:G1435-G1441). Esto se confirmó en nuestro estudio (Figura 2B). En contraste, la captación de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA estaba inalterada cuando el pH variaba de 4,0 a 7,4 (Figura 2A). La ausencia de dependencia de temperatura y pH sugiere que la captación de [Dmt^{1}]DALDA en células Caco-2 no está mediada por PEPT1 (transportador de péptidos 1).

Ejemplo 4. Efecto de DEPC sobre la captación de [Dmt^{1}]DALDA y Gly-Sar.

Para demostrar adicionalmente que PEPT1 no está implicado en el transporte de [Dmt^{1}]DALDA, se examinó el efecto de DEPC (dietilpirocarbonato; 0,2 mM) sobre la captación de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA y [^{14}C]Gly-Sar. DEPC es un reactivo modificador de restos de histidina que ha demostrado inhibir PEPT1 en células Caco-2 (Terada et al., FEBS. Lett., 1996, 394: 196-200). La adición de DEPC al medio de incubación inhibió significativamente la captación de [^{14}C]Gly-Sar (Figura 2D). Sorprendentemente, DEPC no solamente no inhibió la captación de [^{3}H] [Dmt^{1}]DALDA sino que también aumentó realmente la captación de [Dmt^{1}]DALDA en 34 veces (Figura 2C).

Ejemplo 5. Internalización de [Dmt^{1}]DALDA en diferentes tipos celulares.

Para demostrar que la internalización de [Dmt^{1}]DALDA no estaba limitada a células Caco-2, se comparó la internalización de [Dmt^{1}]DALDA en varias líneas celulares diferentes. Se incluyó una etapa de lavado con ácido para distinguir la radiactividad internalizada (resistente a ácido) de la radiactividad unida a superficie (sensible a ácido). La Figura 3A compara los niveles de radiactividad resistente a ácido en células Caco-2, SH-SY5Y, HEK293, y CRFK. Los resultados muestran que [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA se recogió extensivamente en todos los tipos celulares.

Ejemplo 6. Ensayos de unión de radioligando con [^{3}H]Dmt^{1}]DALDA.

Para determinar si [Dmt^{1}]DALDA se internalizada mediante mecanismos mediados por receptor, se realizó ensayos de unión de radioligando ([^{3}H][Dmt^{1}]DALDA) con membranas preparadas a partir de células Caco-2 y células SH-SY5Y. La Figura 3B muestra la unión específica de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA a membranas SH-SY5Y. El valor calculado de K_d fue 118 pM (intervalo 87-149) y el valor de B_{max} se estimó en 96 fmol/mg de proteína (intervalo 88-104). Esto es comparable con los valores obtenidos usando receptor μ-opioide humano recombinante expresado en células de ovario de hámster chino (G.-M. Zhao y H. H. Szeto, datos no publicados). No se observó unión específica de alta afinidad con membranas Caco-2 (Figura 3B). Se sabe que las células HEK293 no tienen receptores opioides (Blake et al., J. Biol. Chem., 1997, 272: 782-790).

Ejemplo 7. Flujo saliente de [Dmt^{1}]DALDA y Gly-Sar desde células Caco-2.

La consecución de niveles estacionarios de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA en células Caco-2 después de <30 min. de incubación sugirió que la velocidad de flujo saliente del péptido desde la célula era igual a la velocidad de captación en ese tiempo. Para examinar el flujo saliente de Gly-Sar y [Dmt^{1}]DALDA desde la célula, se precargaron células Caco-2 con [^{14}C]Gly-Sar o [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA y después se remplazaron con medio fresco que no contenía péptido. La Figura 4A muestra que el 39% de [^{14}C]Gly-Sar se encontraba en el medio después de 1 h a 37ºC. El flujo saliente de [^{14}C]Gly-Sar estaba significativamente reducido a 4ºC. El flujo saliente de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA desde células Caco-2 era mucho más rápido, con un 80% del péptido evacuado en el medio en 1 h (Figura 4A). En contraste con la internalización de [^{3}H] [Dmt^{1}]DALDA (Figura 1A), la temperatura tuvo un efecto significativo sobre el flujo saliente de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA desde la célula (Figura 4A). El flujo saliente de [Dmt^{1}]DALDA se disminuyó en células tratadas con DEPC (Figura 4B). La reducción en el flujo saliente de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA por DEPC es coherente con la captación enormemente aumentada de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA en presencia de DEPC (Figura 2C). Por otro lado, el flujo saliente de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA no estaba afectado por verapamilo, un inhibidor de P-glucoproteína (Figura 4C). El verapamilo tampoco tuvo efecto sobre la captación celular de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA (Figura 4D).

El flujo saliente de [Dmt^{1}]DALDA desde la célula puede ser beneficioso si tras escisión enzimática después de la captación celular del conjugado [Dmt^{1}]DALDA-proteína, [Dmt^{1}]DALDA se evacua de la célula mientras la proteína de carga permanece dentro.

Ejemplo 8. Transporte transcelular de [Dmt^{1}]DALDA y Gly-Sar.

Se usaron monocapas Caco-2 cultivadas en Transwells para estudiar el transporte apical-a-basolateral de [^{3H}][Dmt^{1}]DALDA y [^{14}C]Gly-Sar. La Figura 5 ilustra el transporte de [^{14}C]Gly-Sar y [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA en el lado basolateral en diversos momentos después de la carga del péptido en el lado apical del Transwell. El porcentaje de [^{3}H][Dmt^{1}]DALDA translocado desde el lado apical hasta el basolateral en 60 min. (10,4%) fue comparable con el porcentaje de [^{14}C]Gly-Sar transportado (11,9%). El coeficiente de permeabilidad aparente se estimó en 1,24, x 10^{-5} cm/s para [Dmt^{1}]DALDA y 1,26 x 10^{-5} cm/s para Gly-Sar.

Ejemplo 9. Visualización de captación celular de péptidos catiónicos aromáticos usando CLSM.

Para visualizar la captación y modo de internalización celular de péptidos catiónicos aromáticos, se estudiaron dos péptidos fluorescentes ([Dmt^1,dnsDap^4]DALDA y [Dmt^1,atnDap^4]DALDA) por CLSM. La Figura 6 muestra la internalización del péptido fluorescente en células Caco-2 después de incubación con [Dmt^1,dnsDap^4]DALDA 0,1 μM durante 15 min. a 37ºC. La fluorescencia apareció difusa en todos el citoplasma son distribución vesicular aparente, lo que sugiere que la captación del péptido no implicaba endocitosis y el péptido no está encerrado en un endosoma. Obsérvese también que el péptido estaba completamente excluido del núcleo. La internalización de [Dmt^1,atnDap^4]DALDA en células SH-SY5Y después de incubación con [Dmt^1,atnDap^4]DALDA 0,1 μM durante 30 min. a 4ºC apoya claramente un mecanismo de captación no endocitótica independiente de energía, porque la endocitosis es un proceso dependiente de energía.

Ejemplo 10. Acoplamiento de péptidos al reticulante SMCC y confirmación por espectrometría de masas.

Se disolvieron SMCC (1 μg) y 5 μg de [Dmt^1]DALDA, [Phe^1]DALDA, o [d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2] juntos en 2 ml de PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., y se almacenaron a 4ºC. Se mezcló una alícuota de la muestra con matriz (ácido 3-hidroxi picolínico (HPA) saturado en acetonitrilo al 50%, 10 mg/ml de citrato de amonio) en una proporción 1:10, y se aplicó de forma puntual sobre una placa diana de acero inoxidable. Las muestras Las muestras se analizaron por espectrometría de masas por desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) (Applied Biosystems (Voyager DE Pro)) en el modo Reflectron positivo. Los pesos moleculares de los péptidos y sus respectivos conjugados péptido-SMCC se indican en los espectros de masas (Figura 7).

Ejemplo 11. Péptido conjugado con una proteína de carga lleva la proteína de carga al interior de las células.

Se reticularon diversos péptidos con β-galactosidasa (E. coli recombinante, Sigma-Aldrich) usando un reticulante SMCC (Pierce). SMCC reacciona con moléculas que contienen amina (Lys^4 de [Dmt^1]DALDA) para formar enlaces amida estables. La formación de conjugados péptido-SMCC se confirma por espectrometría de masas (Figura 7). Su extremo maleimida puede entonces conjugarse con un compuesto que contiene sulfhidrilo para crear un enlace tioéter (Bioconjugate Techniques de Greg T. Hermanson, Academic Press, página 234-237). La β-Gal contiene abundantes grupos sulfhidrilo libres en su estado nativo. La captación de β-Gal proporciona una lectura conveniente con el uso de X-gal.

En resumen, se mezcló 1 ml de [Dmt^1]DALDA, [Phe^1]DALDA o [d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2] 5 x 10^{-3}M con 1 mg de SMCC en tampón fosfato durante 1 h a temperatura ambiente. Esto debe producir "péptido activado". El "péptido activado" se diluyó 1:10 con tampón fosfato. Se añadió 1 mg de β-Gal a 1 ml del "péptido activado" 1:10 y se mezcló a 4ºC durante 2 h o durante una noche.

Las células (células de neuroblastoma N_2A o Caco-2) se sembraron en placas de 96 pocillos (2 x 10^4 células/pocillo) y se incubaron con β-Gal o β-Gal reticulado con [Dmt^1]DALDA, [Phe^1]DALDA o [d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2] durante 1 h a 37ºC. Las células después se lavaron 4 veces con tampón fosfato. Las células después se tiñeron con conjunto de tinción con β-gal (Roche) durante al menos 2 h a 37ºC y se examinaron bajo el microscopio.

No se observó captación de β-Gal cuando las células Caco-2 se incubaban con β-Gal (Figura 8A). La presencia de células azules indica captación de β-Gal conjugada con [Dmt^1]DALDA en células Caco-2 (Figura 8B). También se encontró captación potenciada de β-Gal cuando se conjugaba con [d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2] (Figura 8C) o [Phe^1]DALDA (Figura 8D). La conjugación de β-Gal con SMCC solo no potenció la captación.

Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron células neuronales N_2A o células CHO (células de ovario de hámster chino).

Ejemplo 12: La co-incubación con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC potencia la captación de proteína verde fluorescente (GFP) en células Huh7.

Las células Huh7 (1x10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 0,5 ml de DMEM que contenía 3 μg de GFP solo, 3 μg de GFP y 40 μl de [Dmt^1]DALDA, o 3 μg de GFP y 40 μl de [Dmt^1]DALDA conjugado con SMCC durante 60 min. a 37ºC. Después se añadieron 2 ml de medio celular a las células y se incubaron durante 24 horas adicionales en incubadora de cultivo celular. Después de incubación, las células se lavaron cuatro veces en medio celular y se visualizó la GFP retenida en células vivas por microscopía de barrido láser confocal. La excitación se realizó a 340 nm y se midió la emisión a 520 nm.

La Figura 9 (panel superior) representa imágenes de GFP a través de secciones óptimas horizontales centrales de 0,8 μm de grosor de células Huh7. La Figura 9 (panel inferior) representa diferentes imágenes de contraste de interacción diferencial en el mismo campo.

La co-incubación de GFP con [Dmt^1]DALDA mostró fluorescencia moderadamente aumentada dentro del citoplasma celular (Figura 9B) en comparación con incubación con GFP solo (Figura 9A). No se observó fluorescencia verde en

el núcleo. La co-incubación de GFP con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC mostró captación incluso mayor de GFP (Figura 9C). Estos datos muestran que [Dmt^1]DALDA puede promover la captación de proteína en células por solamente mezcla física del péptido modificado con la proteína, y que la conjugación química entre el péptido y la proteína no es necesaria.

Ejemplo 13: Conjugación de [Dmt]^{1}DALDA con un oligo ARN.

Se fosforiló oligo ARN sintético (40 nucleótidos de longitud) en el extremo 5' usando γ^{32}P-ATP en la reacción con polinucleótido quinasa. El producto se purificó en gel para la reacción. Se conjugaron 500.000 recuentos por minuto de oligo ARN purificado en gel en la reacción con [Dmt]^{1}DALDA 10 mM en presencia de 1 mg de EDC (N-[3-dimetilaminopropil-N'-etilcarboiimida]). El producto de reacción de conjugación ([Dmt]^{1}DALDA-oligo ARN) y oligo ARN de control solo se analizaron en gel de poliacrilamida al 15% urea. Dos bandas distintas en el gel indican el oligo ARN solo y el conjugado [Dmt^1] DALDA-oligo ARN (Figura 10).

Ejemplo 14: Captación de conjugado [Dmt]^{1}DALDA-oligo ARN en células Caco-2.

Las células Caco-2 (1 x 10^6) se lavaron tres veces en medio DMEM y se preincubaron en DMEM durante 5 minutos antes de la adición de oligos. Después se añadió conjugado [Dmt]^{1}DALDA-oligo ARN o ARN no conjugado (aproximadamente 20.000 recuentos por minuto cada uno) al medio celular y se incubaron durante 60 min. a 37ºC.

Después de la incubación, se retiró el medio de reacción y las células se lavaron cuatro veces con DMEM y una vez en solución de acetato sódico para reducir la unión no específica. Finalmente, las células se incubaron en tampón de lisis durante 30 minutos y se midió la radiactividad en el lisado celular.

Las células Caco-2 mostraron captación más de tres veces superior de conjugado [Dmt^1] DALDA-oligo ARN en comparación con oligo ARN no conjugado solo (Figura 11). Por lo tanto, [Dmt]^{1}DALDA promueve el paso de oligo ARN a través de la membrana celular.

Ejemplo 15: Mezcla de ARN con [Dmt^1]DALDA-enlazador SMCC aumenta la captación de ARN en células.

El complejo portador se formó por mezcla física de ARN y conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC. El conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC se preparó mezclando [Dmt^1]DALDA con el reticulante SMCC como se ha descrito en métodos. Se mezcló un [^{32}P]oligo ARN de 11 monómeros monocatenario con el conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC durante 15 min. a temperatura ambiente antes de su uso en estudios de captación celular.

Las células Huh7 (1x10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y después se incubaron con 1,0 ml de DMEM que contenía el [^{32}P]oligo ARN (~100.000 cpm) solo o con 40 ml de conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC a 37ºC o 4ºC. Las células después se lavaron cuatro veces en DMEM y una vez en solución de acetato sódico para retirar la unión no específica antes de incubarse en tampón de lisis durante 30 min. y se determinó la radiactividad retenida.

La co-incubación de oligo ARN con [Dmt^1]DALDA-SMCC a 37ºC aumentó la captación del oligo ARN como una función del tiempo (Figura 12A). A una hora, la captación de oligo ARN en presencia de [Dmt1]DALDA-SMCC estaba aumentada ~20 veces en comparación con incubación con ARN solo. La captación de ARN se potenció significativamente por [Dmt1]DALDA-SMCC incluso a 4ºC (Figura 12B). Estos datos muestran que es posible potenciar la captación de ARN sin conjugación química con [Dmt^1]DALDA. La captación a 4ºC indica captación por procesos no endocitóticos independientes de energía, coherentes con la capacidad de [Dmt^1]DALDA de penetrar en las membranas celulares por difusión pasiva.

Además de [Dmt^1]DALDA-SMCC, la co-incubación con [Phe^1]DALDA-SMCC o [d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2]-SMCC también potenció la captación del oligo ARN de 11 monómeros. La Figura 12C muestra el aumento en la captación de ARN cuando se incubaba con los tres diferentes conjugados péptido-SMCC durante 15 min. a 37ºC.

La co-incubación con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC también puede promover la captación celular de una molécula mucho más grande (1350 monómeros) como se muestra en la Figura 13, aunque no tanto como para un oligo más pequeño.

Ejemplo 16. Conjugación de [Dmt^1]DALDA con un oligo ADN.

Se disolvieron SMCC (1 μg) y [Dmt^1]DALDA (SS002; 5 μg) juntos en 2 ml de PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., y se mezclaron con oligo ADN 3'-tiol desprotegido a 4ºC durante 24 horas. Después de incubación, se mezcló una alícuota de mezcla con matriz (ácido 3-hidroxi picolínico (HPA) saturado en acetonitrilo al 50%, 10 mg/ml de citrato de amonio) en una proporción 1:10, y se aplicó de forma puntual en una placa diana de acero inoxidable.

La formación del conjugado ADN-[Dmt^1]DALDA se confirmó por MALDI-TOF MS. Los pesos moleculares de oligo ADN 3'-tiol y complejo covalente [Dmt^1]DALDA-ADN se encontraron en 6392 y 7171, respectivamente (Figura 14A).

Ejemplo 17. Captación de conjugado [Dmt]^{1}DALDA-oligo ADN en células Caco-2.

Se conjugó un ADN de 20 monómeros 3'-tiol-modificado con [Dmt^1]DALDA usando SMCC, y la formación del conjugado se confirmó por espectroscopía de masas. Los oligo ADN tanto conjugados como no conjugados se radiomacaron en el extremo 5' con ^{32}P y se purificaron en gel (Figura 14B).

Las células neuronales N_2A (1 x 10^6 células/pocillo) se lavaron con DMEM y se incubaron con 1 ml de DMEM que contenía oligo ADN conjugado con [Dmt^1]DALDA o no conjugado (~100.000 dpm) durante 2 h o 19 h a 37ºC y CO_2 al 5%. Las células después se lavaron cuatro veces en DMEM y una vez en solución de acetato sódico para reducir la unión no específica. Las células después se incubaron en tampón de lisis durante 30 min. y se determinó la radiactividad retenida.

La captación de ADN conjugado con [Dmt^1]DALDA fue mayor en comparación con ADN no conjugado después de 19 h de incubación (Figura 15), lo que indica que la captación de ADN puede potenciarse por conjugación con [Dmt^1]DALDA.

Ejemplo 18. Los péptidos y conjugados péptido-SMCC no son tóxicos para las células

Ni los péptidos ni los conjugados péptido-SMCC son tóxicos para las células en cultivo. El tratamiento con [Dmt^1]DALDA (1 nM a 10 μM) durante 24 h no tuvo efecto sobre la viabilidad celular medida por el ensayo MTT (ensayo MTS, Promega, Madison, WI) en células N_2A (Figura 16), células SH-SY5Y o células Caco-2. Estudios similares con [D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2) tampoco mostraron efectos sobre la viabilidad celular.

La incubación de células en cultivo con los conjugados péptido-SMCC tampoco afectó a la viabilidad celular medida por la captación de azul tripano. El azul tripano solamente se recoge por células con permeabilidad aumentada de membrana. Las células Huh7 (1 X 10^6) se lavaron tres veces en DMEM, y 1 ml de medio fresco, o medio que contenía 50 μl de conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC, conjugado [D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2]-SMCC, o conjugado [Phe^1]DALDA-SMCC 1 mM, y se incubaron a 37ºC durante 24 horas al 5% de CO_2. Las células después se lavaron tres veces con DMEM, y se añadió 1 ml de azul tripano al 0,4% a las células durante 2 minutos. El colorante excesivo se retiró lavando las células en medio celular y las células se examinaron por microscopía óptica.

El examen de las células por microscopía óptica demostró que las células incubadas con medio solo mostraban captación mínima de azul tripano. No se observó aumento en la captación de azul tripano en células incubadas con [Dmt^1]DAL-DA-SMCC, [D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2]-SMCC, o [Phe^1]DALDA. En contraste, la incubación de células con DEPC (dietilpirocarbonato) provocó una captación significativa de azul tripano.

La incubación de células en cultivo con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC tampoco indujo apoptosis en células Huh7 en cultivo. Las células Huh7 (1 X 10^6 células/pocillo) se lavaron tres veces en DMEM, y se aplicó 1 ml de medio fresco. Después, se añadieron 50 μl de [Dmt^1]DALDA modificado (1 mM) en PBS o PBS solamente (control) al medio celular y se incubaron a 37ºC durante 24 horas al 5% de CO_2. Después de la incubación, se añadió 1 ml de colorante Hoechst (Molecular Probes, Eugene, OR) para teñir los núcleos apoptóticos a las células y se incubaron durante 15 min. adicionales. Se retiró el colorante Hoechst excesivo lavando las células con medio celular (libre de indicador de pH) y las células tratadas con conjugado [Dmt^1]DALDA-SMCC se compararon con células de control usando microscopía fluorescente (excitación a 350 nm y emisión a 461 nm). La apoptosis se indica por concentración de fluorescencia en los núcleos. La Figura 17 demuestra que el nivel de apoptosis en células Huh7 tratadas con [Dmt^1]DALDA-SMCC es el mismo que en células de control.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo portador que comprende (i) un agente citotóxico o un poliaminoácido y (ii) un péptido catiónico aromático, donde el péptido catiónico aromático es:

(a) Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (DALDA); o
(b) 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Dmt^1-DALDA); o
(c) Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Phe^1-DALDA); o
(d) D-Arg-2',6'Dmt-Lys-Phe-NH_2; o
(e) 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 (Dmp^1-DALDA).

2. Un complejo portador de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido catiónico aromático es D-Arg-2',6'Dmt-Lys-Phe-NH_2.

3. Un complejo portador de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido catiónico aromático, el agente citotóxico o el poliaminoácido comprende un enlazador.

4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un complejo portador definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo o excipiente farmacéutico.

5. Un complejo portador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

6. Un complejo portador para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el complejo portador es para suministrar el agente citotóxico o poliaminoácido a una célula que es una célula bacteriana o una célula vegetal o una célula animal, donde la célula animal es preferiblemente una célula de mamífero, siendo preferiblemente dicha célula de mamífero una célula neuronal, una célula epitelial renal, una célula epitelial intestinal, una célula epitelial vascular, una célula epitelial de la barrera hematoencefálica, una célula de la glía o un hepatocito.

7. Un método para suministrar un agente citotóxico o un poliaminoácido a una célula *in vitro,* comprendiendo el método poner en contacto la célula *in vitro* con un complejo portador definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

8. Un complejo portador definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agente citotóxico es doxorubicina.

9. Un complejo portador definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agente citotóxico es adriamicina.

Figura 1

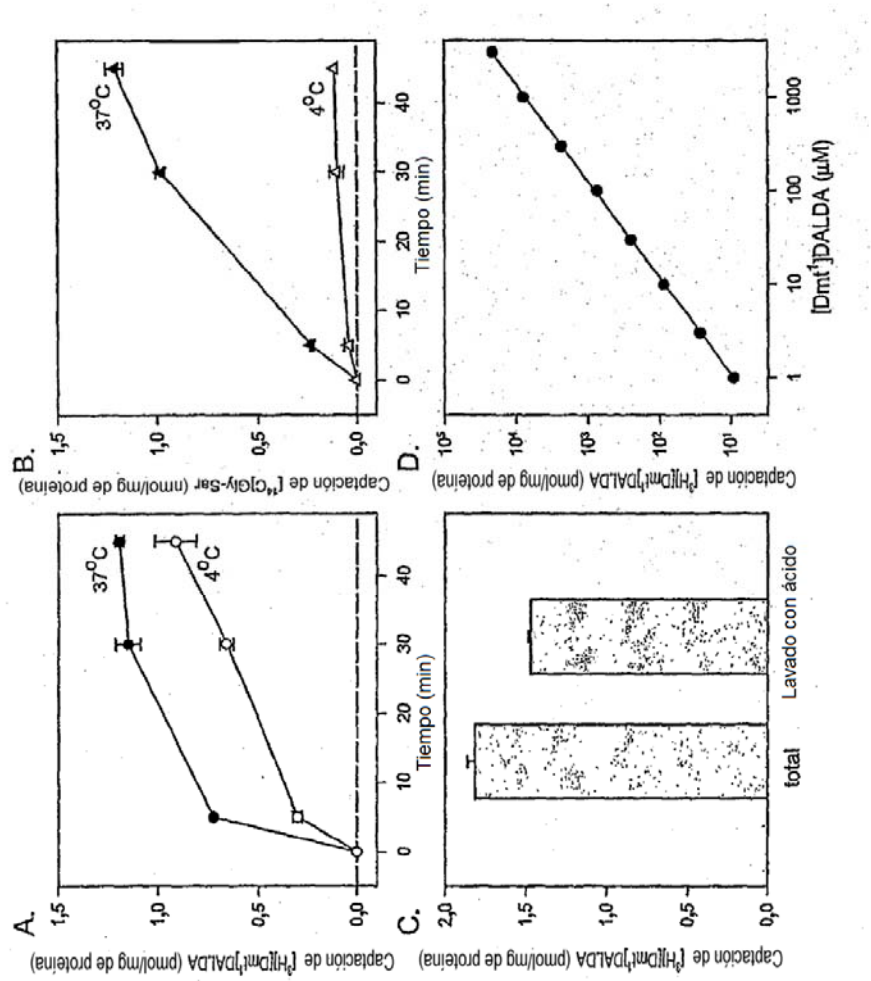

A.
B.
C.
D.
37°C
4°C
Tiempo (min)
Captación de [³H][Dmt¹]DALDA (pmol/mg de proteína)
Captación de [¹⁴C]Gly-Sar (nmol/mg de proteína)
total
Lavado con ácido
[Dmt¹]DALDA (µM)

Figura 2

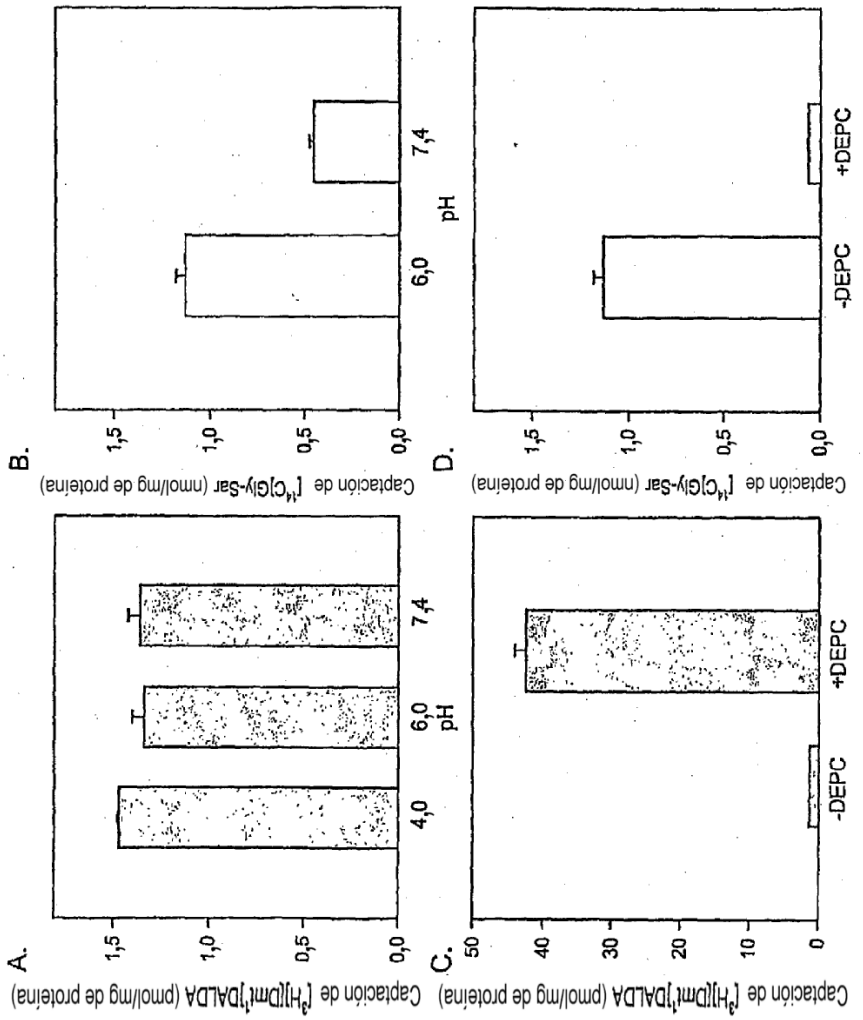

A.
B.
C.
D.
Captación de [³H][Dmt¹]DALDA (pmol/mg de proteína)
Captación de [¹⁴C]Gly-Sar (nmol/mg de proteína)
4,0
6,0
7,4
pH
-DEPC
+DEPC
T
0,0
0,5
1,0
1,5
0
10
20
30
40
50

Figura 3

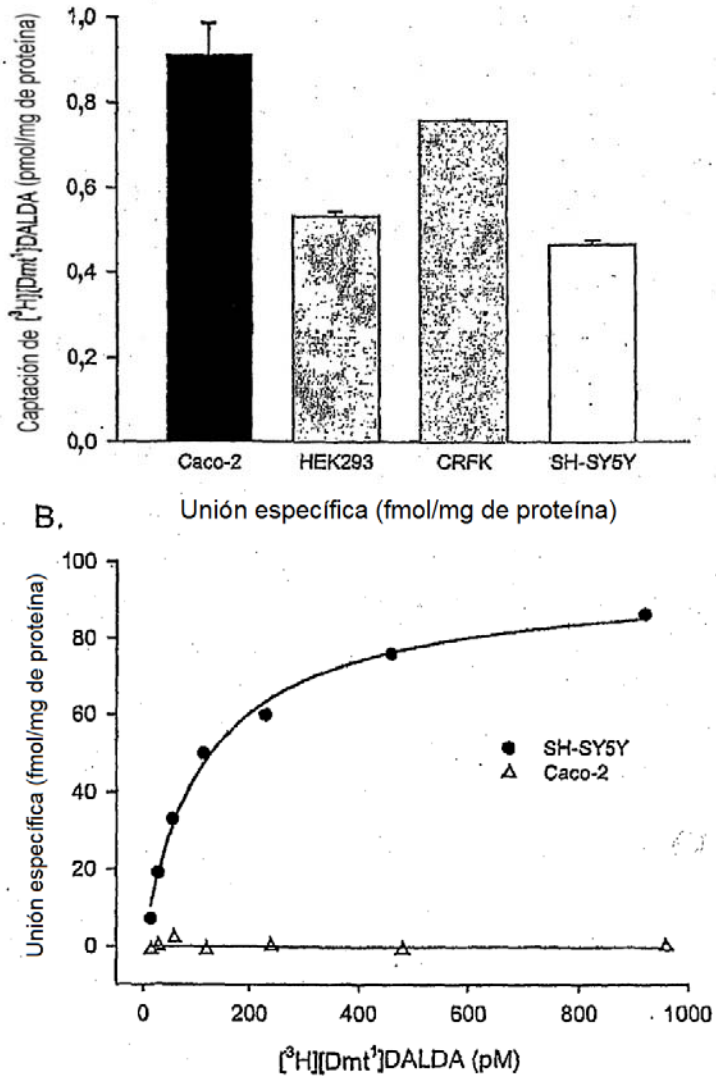

Captación de [3H][Dmt1]DALDA (pmol/mg de proteína)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Caco-2
HEK293
CRFK
SH-SY5Y
Unión específica (fmol/mg de proteína)
B.
Unión específica (fmol/mg de proteína)
100
80
60
40
20
0
SH-SY5Y
Caco-2
0
200
400
600
800
1000
[3H][Dmt1]DALDA (pM)

Figura 4

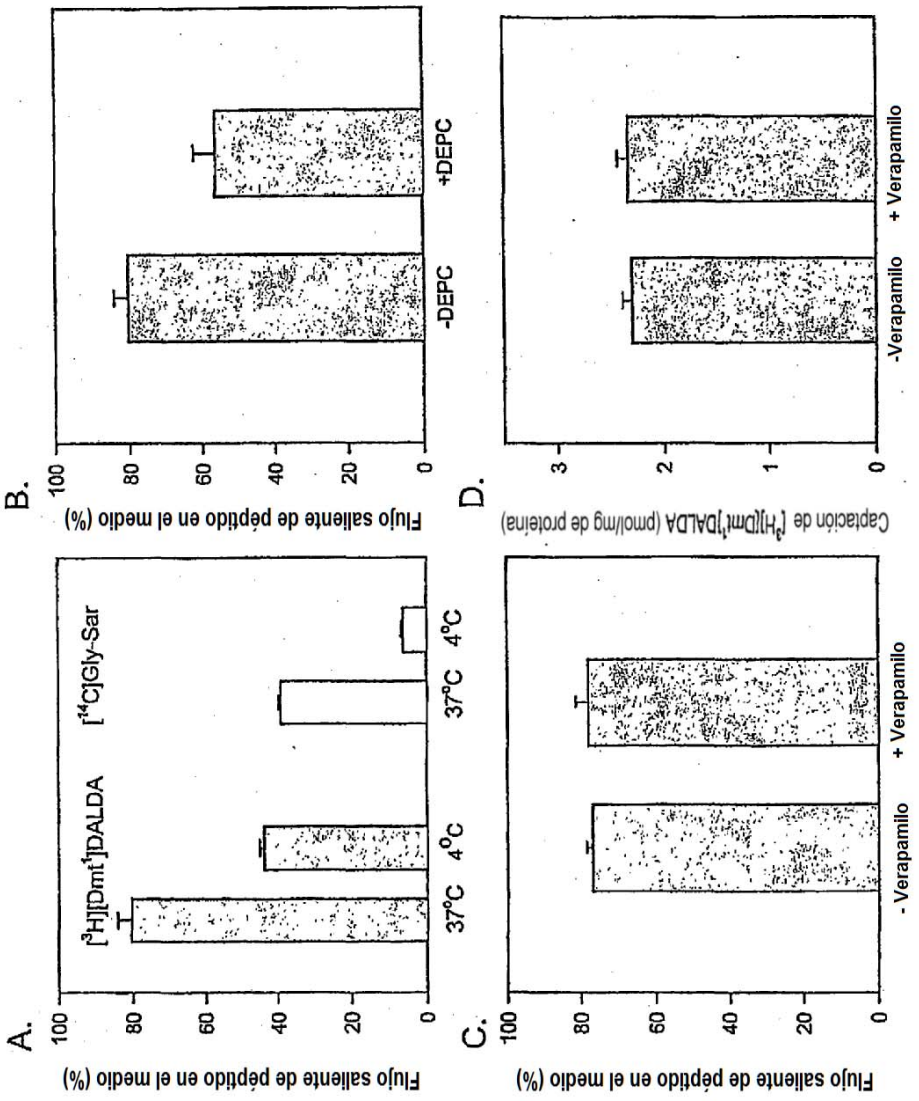
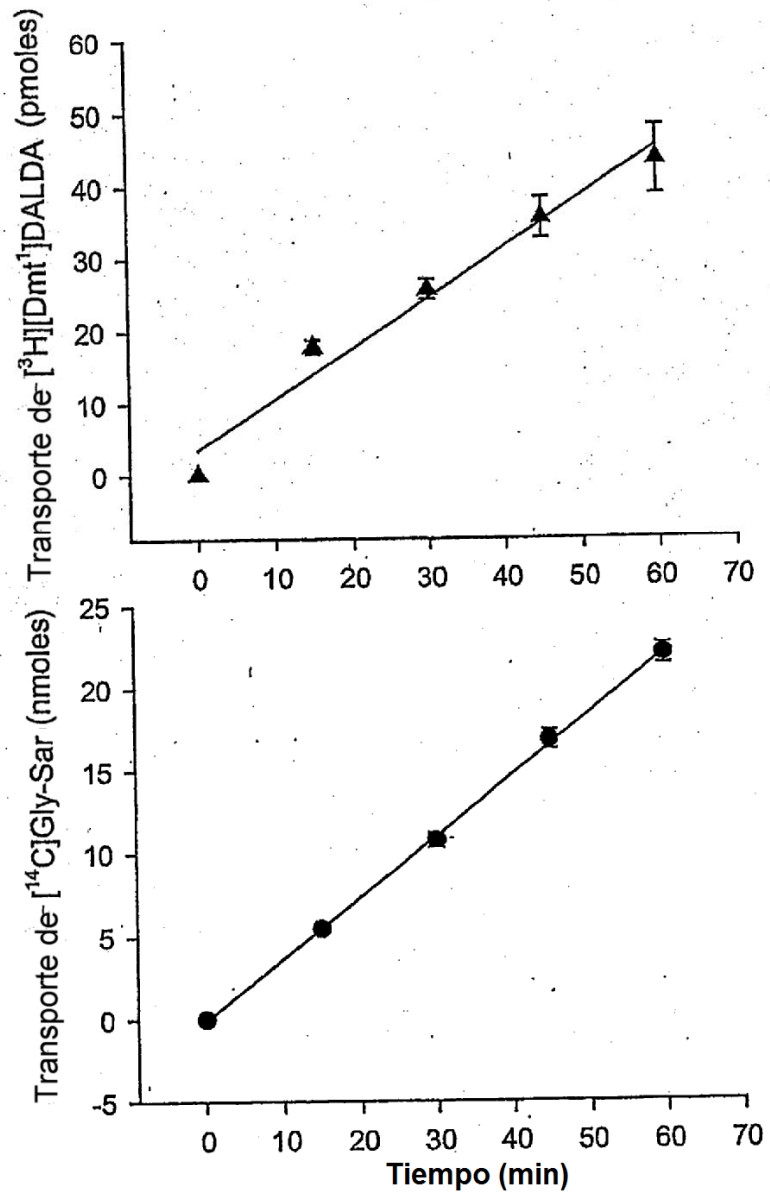

A.
B.
C.
D.
Flujo saliente de péptido en el medio (%)
[3H][Dmt1]DALDA
[14C]Gly-Sar
37°C
4°C
-DEPC
+DEPC
- Verapamilo
+ Verapamilo
Captación de [3H][Dmt1]DALDA (pmol/mg de proteína)

Figura 5


Transporte de [3H][Dmt1]DALDA (pmoles)
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Transporte de [14C]Gly-Sar (nmoles)
25
20
15
10
5
0
-5
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (min)

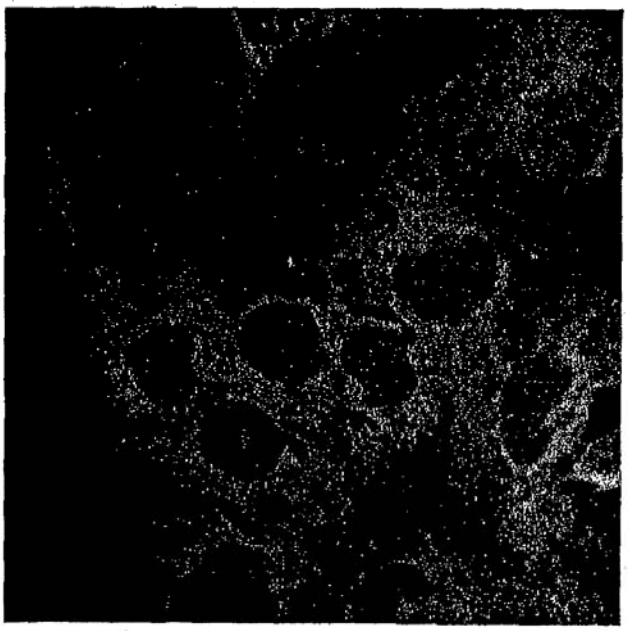
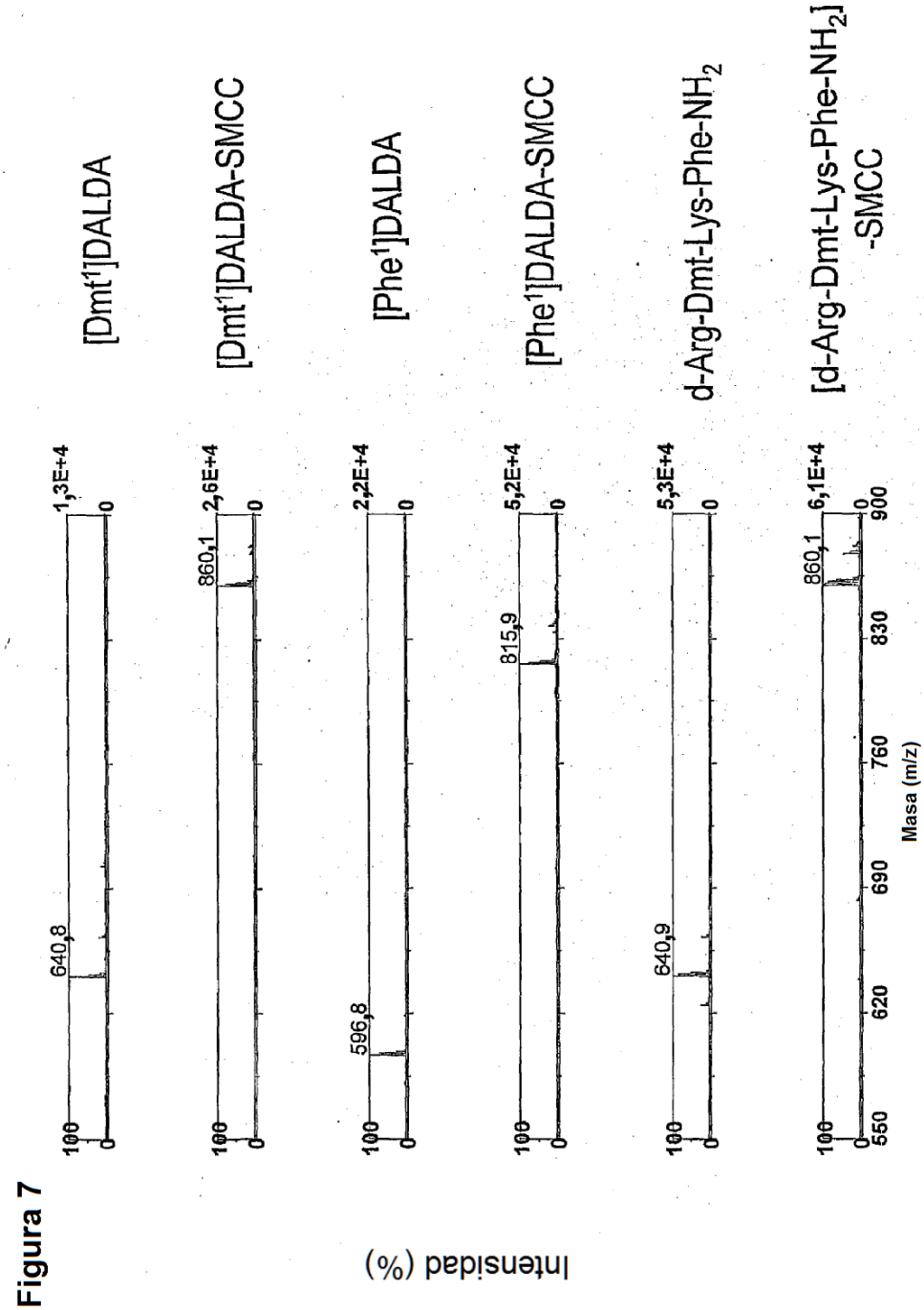


Figura 6

Figura 7


[Dmt[1]]DALDA
[Dmt[1]]DALDA-SMCC
[Phe[1]]DALDA
[Phe[1]]DALDA-SMCC
d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH2
[d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH2]-SMCC
Intensidad (%)
Masa (m/z)

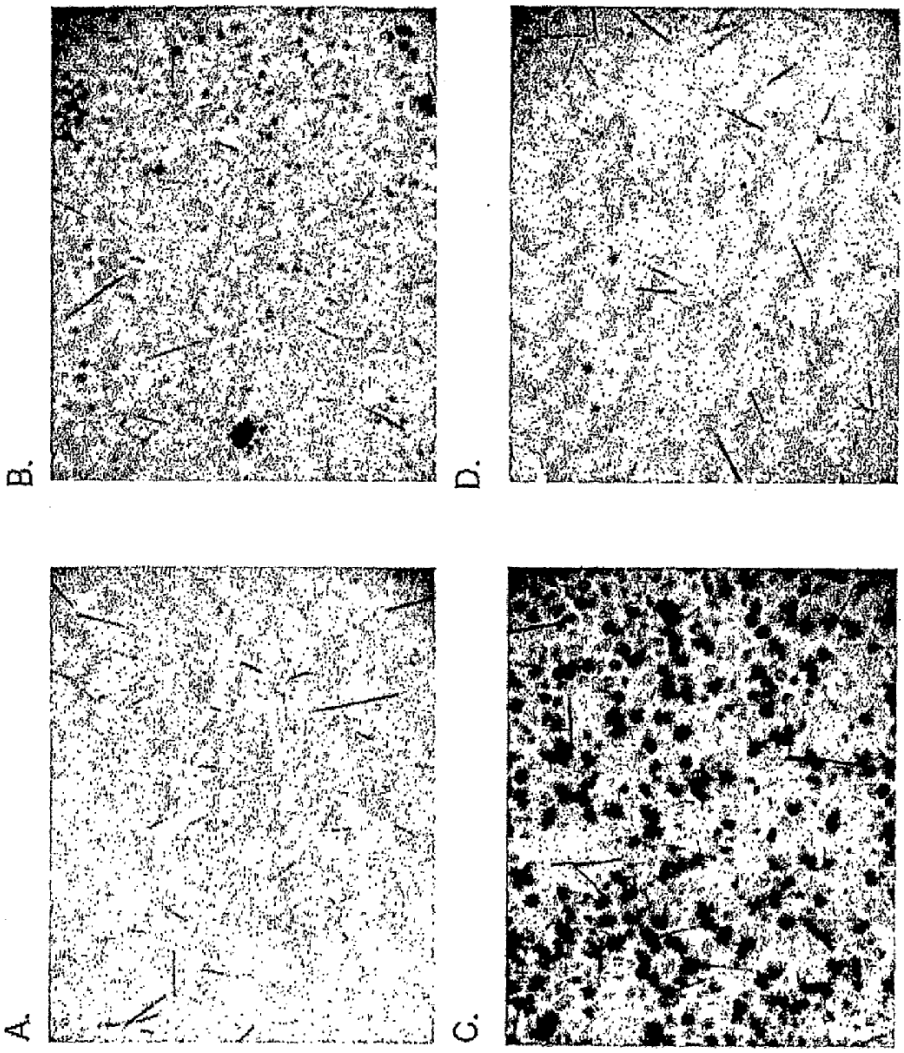


Figura 8

Figura 9

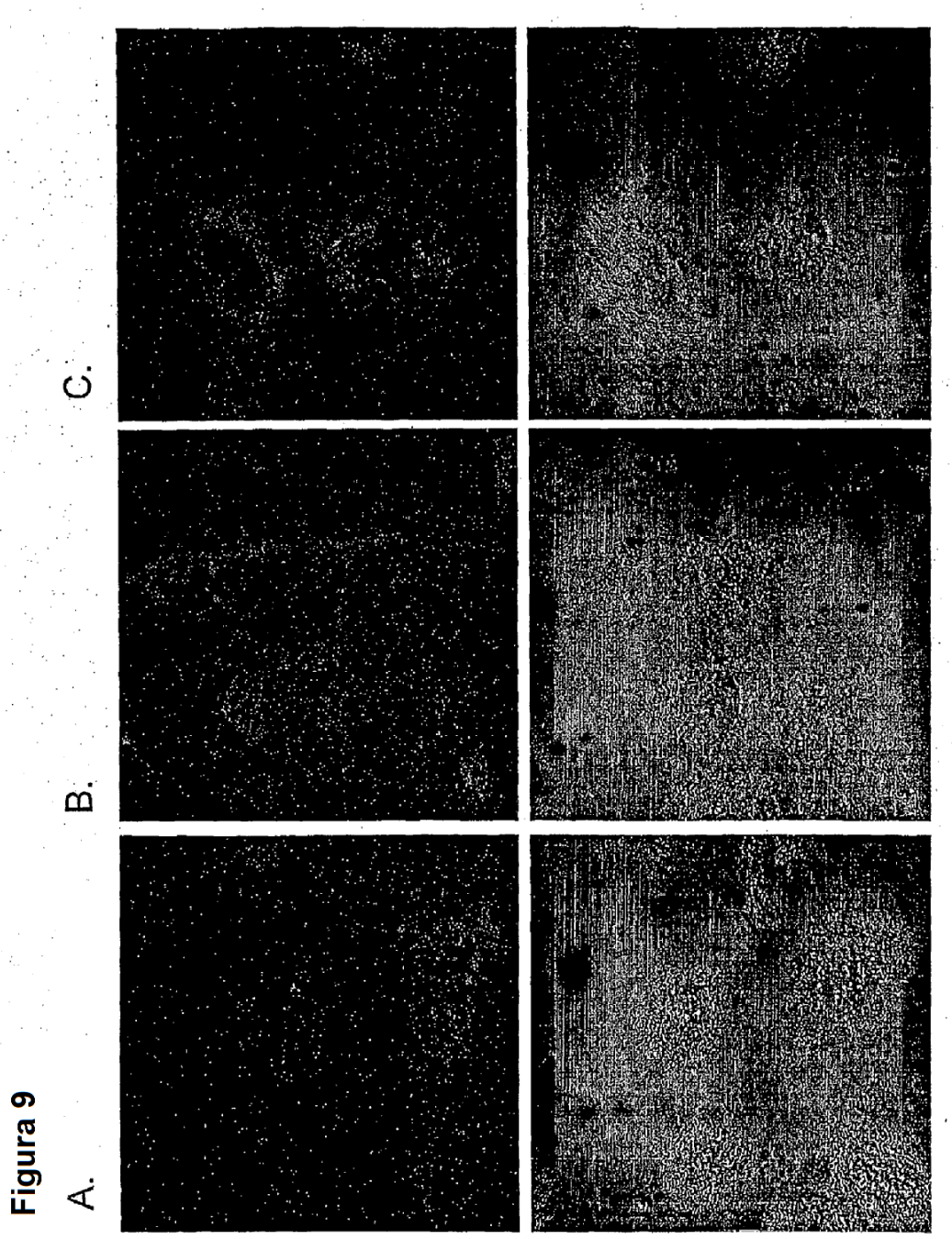


Figura 10

Conjugación [Dmt1]DALDA-oligo ARN
[Dmt1]DALDA-ARN
ARN
SS-02
control

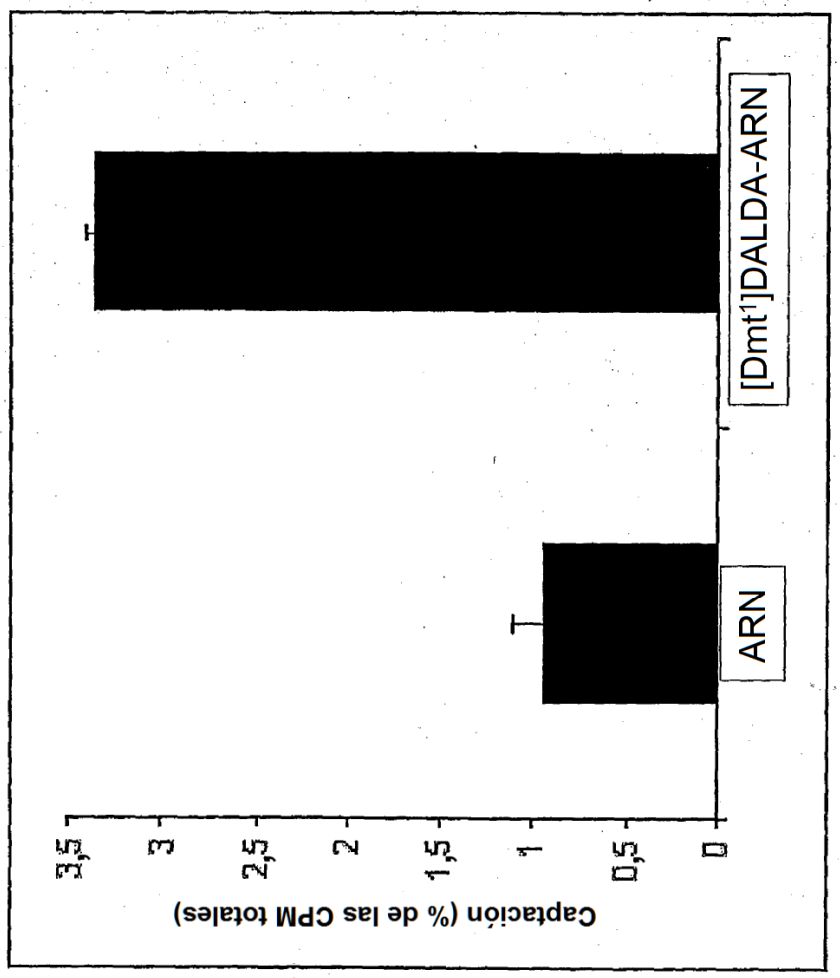

Captación (% de las CPM totales)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
ARN
[Dmt[1]]DALDA-ARN

Figura 11

Figura 12

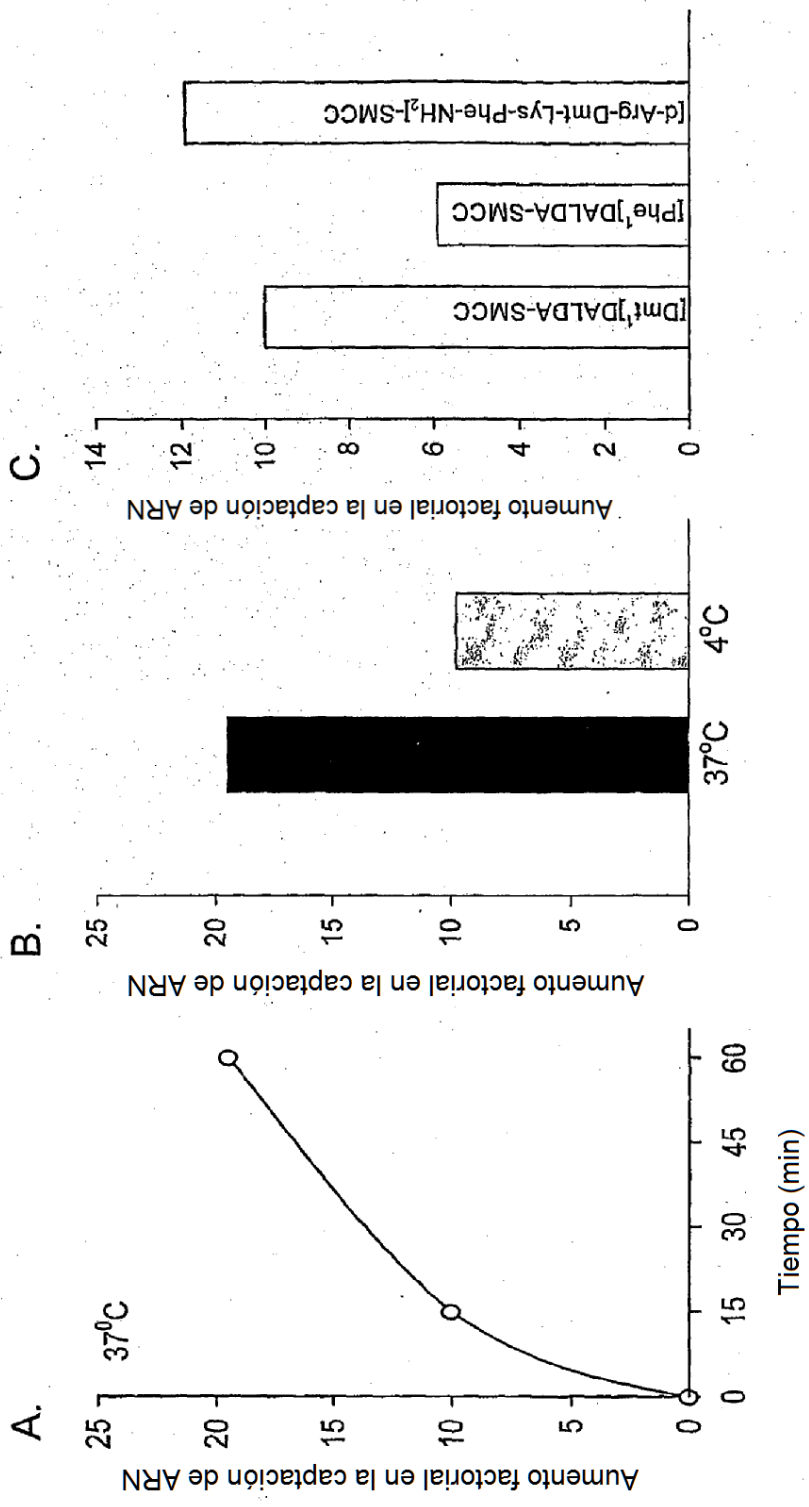

A.
37°C
Aumento factorial en la captación de ARN
Tiempo (min)
B.
37°C
4°C
Aumento factorial en la captación de ARN
C.
[Dmt1]DALDA-SMCC
[Phe1]DALDA-SMCC
[d-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH2]-SMCC
Aumento factorial en la captación de ARN

Figura 13

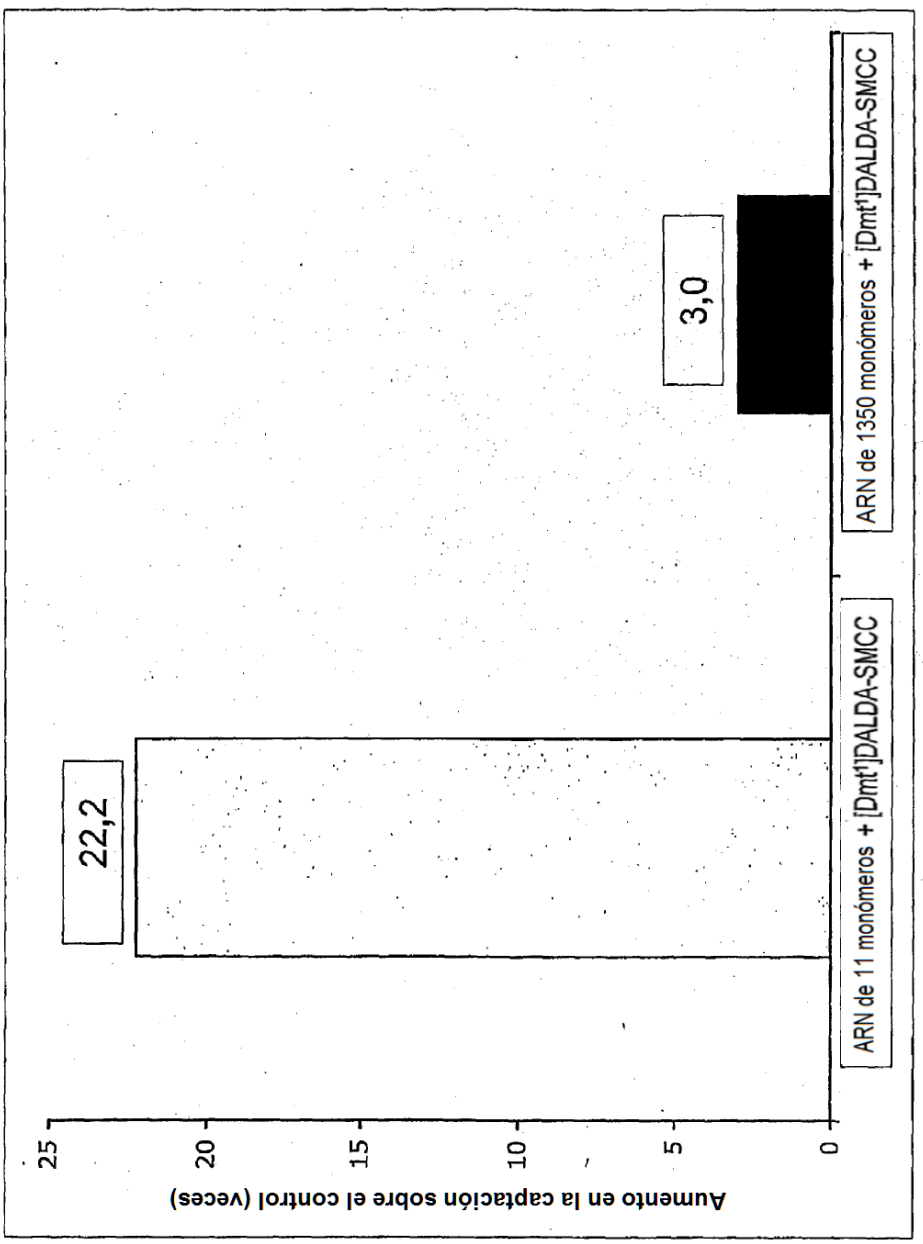

Aumento en la captación sobre el control (veces)
25
20
15
10
5
0
22,2
3,0
ARN de 11 monómeros + [Dmt']DALDA-SMCC
ARN de 1350 monómeros + [Dmt']DALDA-SMCC

Figura 14

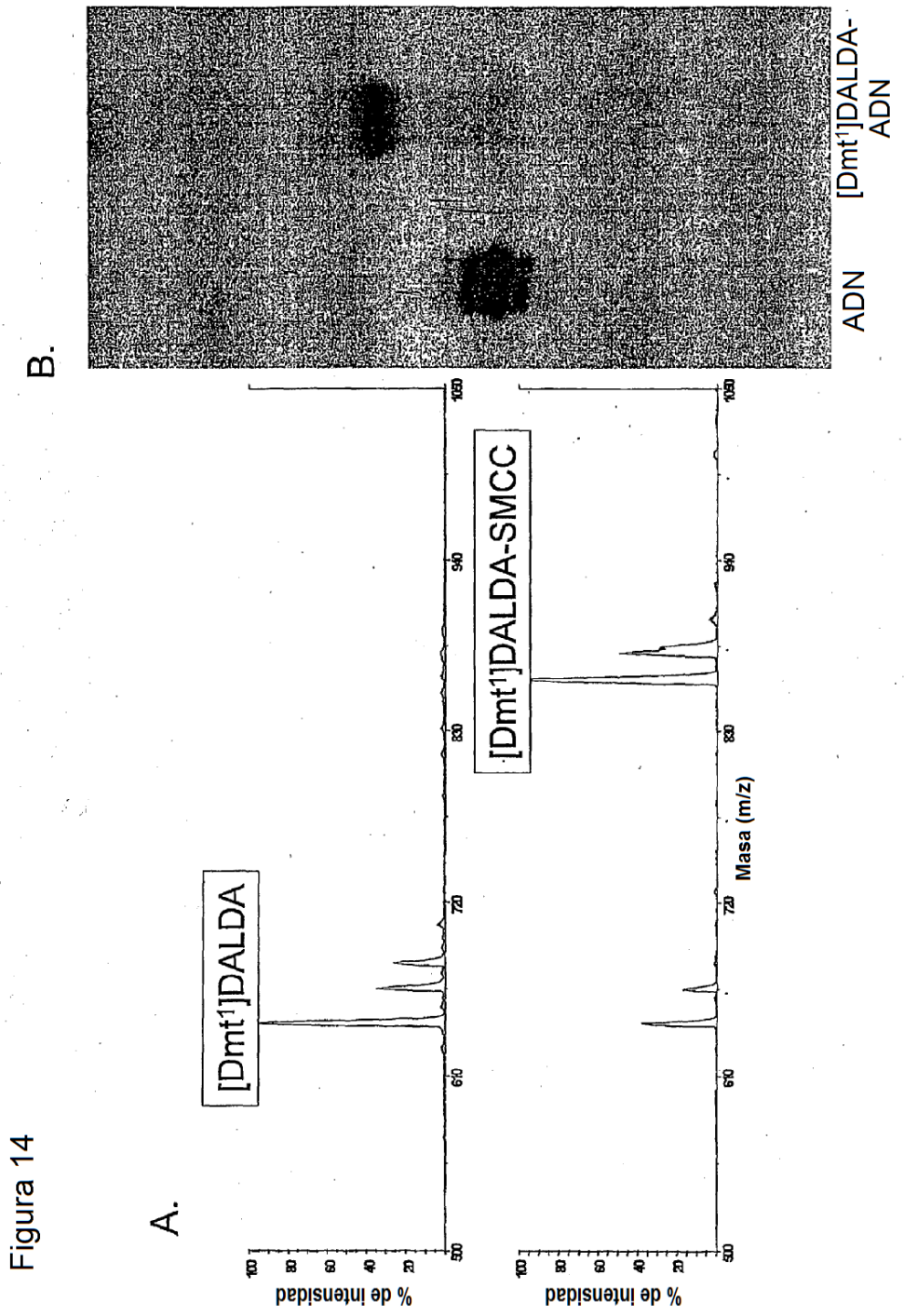
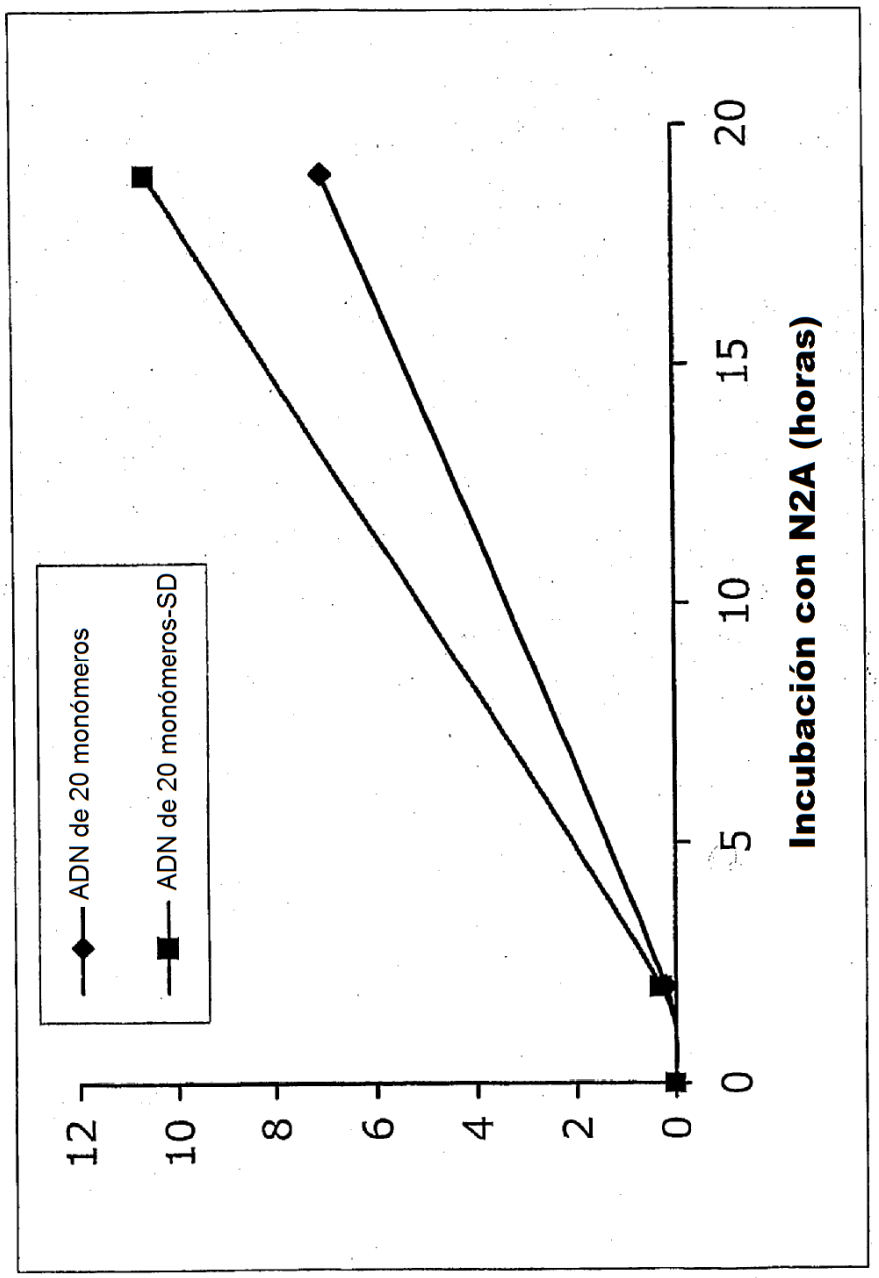

A.
[Dmt¹]DALDA
[Dmt¹]DALDA-SMCC
% de intensidad
% de intensidad
Masa (m/z)
B.
ADN
[Dmt¹]DALDA-ADN

Figura 15


ADN de 20 monómeros
ADN de 20 monómeros-SD
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
Incubación con N2A (horas)

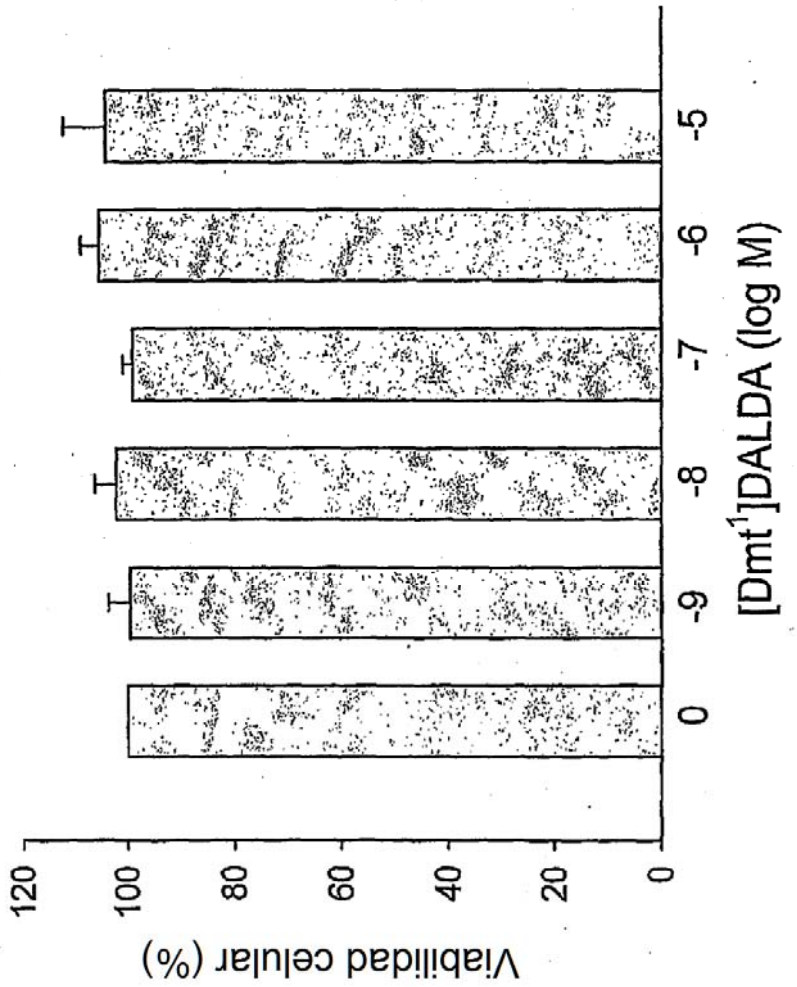

Viabilidad celular (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
[Dmt1]DALDA (log M)

Figura 16

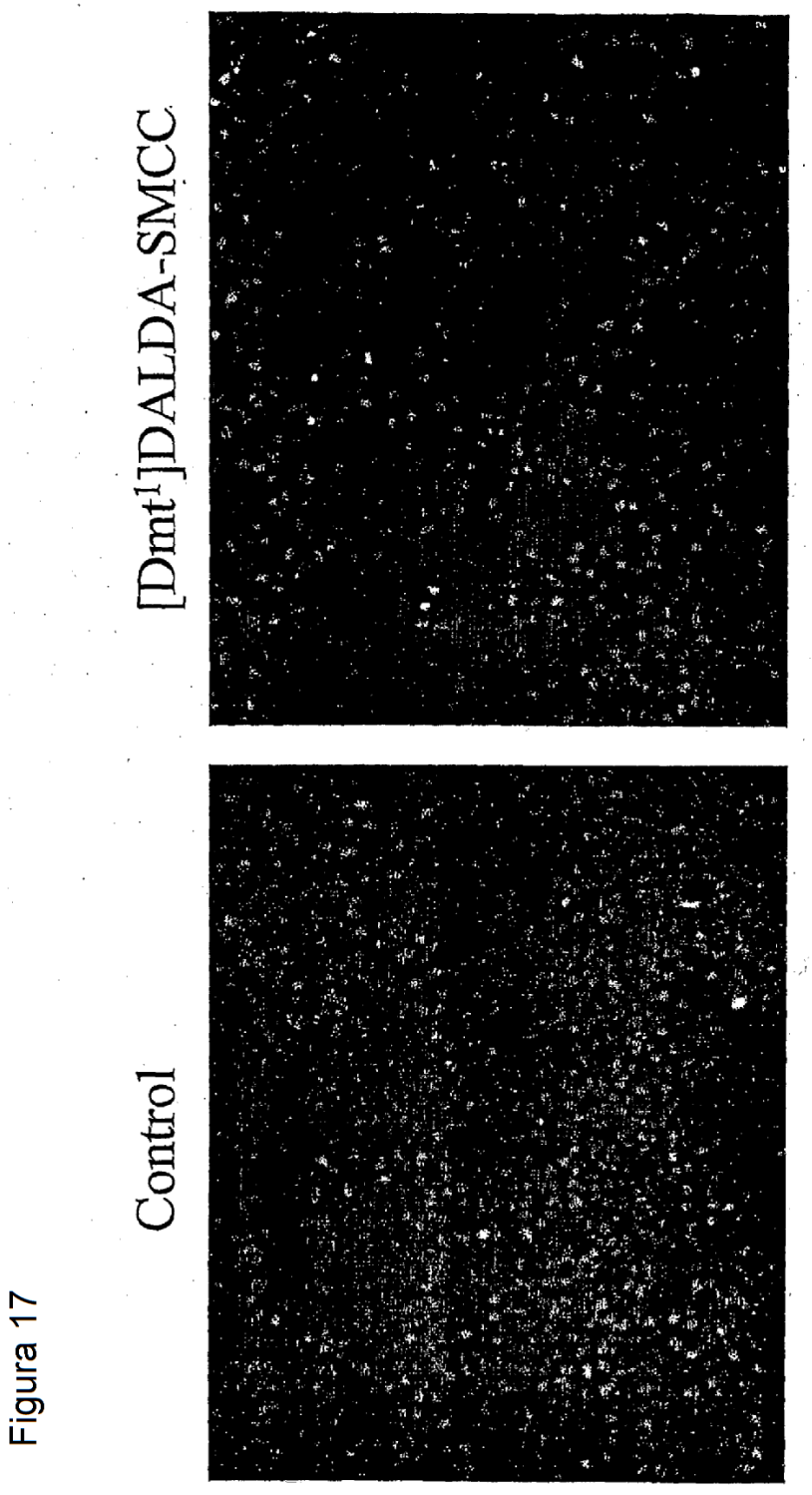


Figura 17