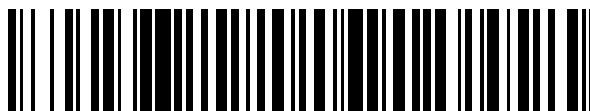


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 181**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/EP2013/073279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13799491 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2917227**

54 Título: **Moléculas transportadoras específicas para proteoglicano C4S**

30 Prioridad:

**08.11.2012 EP 12191840**

**08.11.2012 US 201261723872 P**

**12.02.2013 EP 13154867**

**12.02.2013 US 201361763570 P**

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

**28.06.2019**

73 Titular/es:

**PHI PHARMA SA (100.0%)**

**Place du Midi 36**

**1950 Sion, CH**

72 Inventor/es:

**BONNY, CHRISTOPHE y**

**CHENAUX, FABRICE**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

ES 2 718 181 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

Moléculas transportadoras específicas para proteoglicano C4S

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moléculas, péptidos y polipéptidos aislados de secuencias o estructuras consenso específicas y a compuestos que comprenden o consisten en dichas moléculas, péptidos y polipéptidos, que pueden actuar como moléculas transportadoras que reconocen específicamente a los proteoglicanos, en particular, condroitín-4-sulfato (C4S). Las moléculas, péptidos, polipéptidos y compuestos aislados de la invención pueden estar conjugados o unidos de otro modo a un grupo biológicamente activo (BAM, por sus siglas en inglés, *biologically active moiety*). Por lo tanto, los conjugados de BAM permiten el direccionamiento y suministro específico del BAM, que puede ser, por ejemplo, un péptido, entidad química o ácido nucleico, en el citoplasma y/o núcleos de células que expresan C4S *in vitro* e *in vivo*.

15 **2. Antecedentes de la invención**

Las membranas celulares son generalmente impermeables a las macromoléculas, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos. Además, incluso las moléculas más pequeñas pueden entrar en las células vivas solo a velocidades muy bajas y en presencia de elevadas concentraciones extracelulares potencialmente tóxicas. La ausencia de medios para dirigir y suministrar de manera específica un compuesto de interés en células o tejidos específicos ha sido un obstáculo para el uso terapéutico, profiláctico y diagnóstico o experimental de un número potencialmente grande de moléculas biológicamente activas que tienen sitios de acción intracelulares.

25 Durante la última década, se han investigado varios medios de suministro intracelular de compuestos en un intento de facilitar una transferencia eficaz de una sustancia de interés desde el medio externo al interior de tejidos o células. Los constructos de suministro más comunes se han basado en anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) o en péptidos bacterianos o víricos descubiertos por tener actividad de unión y transporte a la membrana. Por ejemplo, se han investigado constructos transportadores basados en la proteína vírica VP22; polipéptidos que comprenden la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y polipéptidos que comprenden un homeodominio de una proteína de *Antennapedia* (Antp HD), así como fragmentos funcionales y modificaciones de los mismos.

35 La mayoría de los péptidos víricos y bacterianos investigados en constructos de suministro (también denominados péptidos penetrantes en células (PPC)) comprenden péptidos catiónicos ricos en restos básicos, tales como lisina y/o arginina o péptidos que comprenden aminoácidos potenciadores de hélice alfa. Se han usado los PPC para transfectar células *in vitro* en algunos modelos experimentales animales, pero han demostrado un éxito limitado en ensayos clínicos. Se ha postulado que la falta de éxito en la clínica puede surgir de su falta de especificidad por cualquier tipo de célula o tejido particular, así como por la inestabilidad inherente de estos péptidos *in vivo* (mostrando con frecuencia semividas del orden de varios minutos). Para esquivar la falta de estabilidad *in vivo*, se han desarrollado varios PPC estabilizados que han sido modificados químicamente o que contienen aminoácidos no naturales, incluyendo "D" aminoácidos. Por ejemplo, una forma "D"-retro-inverso completa del péptido "TAT" arquetípico ("D-TAT") ha alcanzado la fase clínica 2, pero la potencialmente extremadamente larga persistencia de este péptido ha limitado sus usos a la administración tópica, por ejemplo, al oído o intraocular para el tratamiento de la inflamación en el ojo. La administración sistémica de dichos péptidos estabilizados está contraindicada a causa de su potencial toxicidad.

45 Mediante el reemplazo únicamente de posiciones específicas en el péptido "D-TAT" por L-aminoácidos, se han obtenido péptidos con una semivida intermedia potencialmente más adecuada para su desarrollo clínico. Los constructos transportadores divulgadas en las solicitudes WO 2010/072406, WO 2010/072228 o WO2010/072275, que comprenden aminoácidos con L y D-aminoácidos, son lo suficientemente estables para impedir la degradación por proteasas antes del transporte del grupo de carga a su sitio diana. Además, estos constructos transportadores no parecen persistir de manera permanente en la célula y hasta cierto punto están sujetas a la degradación por proteasas. No obstante, aunque se ha demostrado una actividad transportadora transmembrana eficaz, se ha observado que tras la captación, el grupo de carga del constructo carga-transportador no se escinde fácilmente del grupo transportador, lo que en general es un requisito previo para que el grupo de carga sea biológicamente activo. Además, se ha descubierto que la degradación del constructo carga-transportador es lenta, de tal forma que muestra tendencia a acumularse en la célula diana. Por lo tanto, incluso en caso de que el grupo de carga se acabe liberando o metabolizando, el constructo transportador puede permanecer en la célula durante un tiempo prolongado y participar en procesos inter e intracelulares adicionales, que ocasionen efectos secundarios desconocidos y no deseados. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar compuestos mejorados para el suministro intracelular de grupos de carga deseados.

60 **3. Sumario de la invención**

65 Los inventores han descubierto sorprendentemente que secuencias consenso específicas de péptidos y/o polipéptidos aislados son capaces de unirse de manera específica al proteoglicano C4S, que son selectivos a C4S en relación con otros proteoglicanos (por ejemplo, heparina, dermatano, queratina), que muestran adicionalmente una estabilidad *in*

vivo mejorada en relación con péptidos de un tamaño similar y son capaces de funcionar como péptidos transportadores mejorados/péptidos para el suministro celular e intracelular de moléculas, conjugados a los mismos (por ejemplo, mediante conjugación química o fusión recombinante). Los péptidos o polipéptidos que tienen los polipéptidos tienen las secuencias consenso de acuerdo con (i) o (ii) o las inversas de los mismos:

- (i) Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>, o  
(ii) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>

en donde,

(a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; y en donde el resto de aminoácidos X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que uno de X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, representa L-lisina o L-arginina;

o en donde,

(b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; y en donde el resto de aminoácidos X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que uno de X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, represente D-lisina o D-arginina.

La secuencia consenso (i), anterior, con las condiciones (a) es la SEQ ID NO: 17 y con las condiciones (b) es la SEQ ID NO: 19. La secuencia consenso (ii), anterior, con las condiciones (a) es la SEQ ID NO: 18 y con las condiciones (b) es la SEQ ID NO: 20.

Los presentes inventores han descubierto además que, tal como se refleja en las reglas consenso anteriores, los restos aminoacídicos en las posiciones 2, 4, 6, 8 y 3 (donde la posición 7 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b)) o 7 (donde la posición 3 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b)) no contribuyen a la actividad de unión del péptido. Por lo tanto, el grupo de direccionamiento de los péptidos anteriores, representado por Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub> a condición de que la posición 3 o 7 (pero no ambas) sea una lisina o una arginina, puede considerarse idéntico para todos los posibles péptidos que abarcan las secuencias consenso (con respecto a la representación de las cadenas laterales en 1, 5, 9 y 3 o 7, en el espacio 3D). De hecho, es la disposición lineal en 3D y/o la configuración en 3D de los restos de arginina en las posiciones 1, 5 y 9, junto con la lisina o la arginina en la posición 3 o 7 (pero no ambas) que establece la actividad de unión de las secuencias de grupo de direccionamiento y contribuye a la especificidad y selectividad de unión por C4S en relación con otros proteoglicanos. Los restos aminoacídicos restantes, es decir, las posiciones 2, 4, 6, 8 y 3 (donde la posición 7 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b)) o 7 (donde la posición 3 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b)) sirven principalmente como una cadena principal estructural para mantener la distancia adecuada y la configuración relativa entre las argininas en las posiciones 1, 5 y 9 y la lisina o arginina en la posición 3 o 7 (pero no ambas) del grupo de direccionamiento. Por lo tanto, en tanto que se mantenga la orientación espacial en 3D de estos restos, en particular, la presentación en 3D de las cadenas laterales de restos aminoacídicos, el péptido y/o las composiciones de la invención mostrarán unión específica y selectiva para un proteoglicano, en particular, C4S.

Como tal, la invención se refiere en general a péptidos y polipéptidos aislados que comprenden o consisten en las secuencias consenso de acuerdo con (i) o (ii) anteriores, o a compuestos que comprenden o consisten en dichos péptidos y polipéptidos, así como a constructos de restos aminoacídicos (o compuestos que los comprenden) que tienen una presentación en 3D de 3 restos de arginina (es decir, Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub>) y de una arginina o lisina (es decir, Arg/Lys<sub>3</sub> o Arg/Lys<sub>7</sub> pero no ambos) equivalente a los péptidos y/o grupos de direccionamiento de las secuencias consenso (i) y (ii). Por consiguiente, la invención contempla de manera general tanto el uso de restos aminoacídicos en las posiciones libremente seleccionables (es decir, 2, 4, 6, 8 y 3 (donde la posición 7 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b)), anterior, como una D o L-lisina o D o L-arginina) o 7 (donde la posición 3 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b)), anterior, como D o L-lisina o D o L-arginina)) en el grupo de direccionamiento de secuencias consenso (i) y (ii) y el reemplazo de uno o más de estos restos con cualquier enlazador químico adecuado o espaciador químico adecuado para mantener el espaciado equivalente y la orientación/presentación en 3D relativa de los 3 restos de arginina (es decir, Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub>) y la arginina o lisina (es decir, Arg/Lys<sub>3</sub> o Arg/Lys<sub>7</sub> pero no ambas). La invención abarca moléculas que comprenden o que consisten en restos de aminoácidos y también abarcan moléculas que comprenden tanto restos de aminoácidos como enlazadores/espaciadores químicos, de tal forma que las moléculas muestran 3 argininas y 1 lisina o arginina en la misma conformación en 3 dimensiones o una equivalente a las argininas en las posiciones 1, 5 y 9 y la lisina o arginina en la posición 3 o 7 (pero no ambas) que en los grupos de direccionamiento de secuencias consenso (i) y (ii). Tal como se usa a lo largo de la presente divulgación, una molécula que comprende el reemplazo de uno o más restos aminoacídicos con un enlazador/espaciador químico se denomina un constructo resto-espaciador.

Por motivos de conveniencia, tal como se usa a lo largo de la presente divulgación, las argininas en el constructo resto-espaciador que corresponden a las argininas 1, 5 y 9 de las secuencias consenso (i) y (ii) se citarán como Arg<sub>1</sub>,

Arg5 e Arg9, respectivamente. De manera similar, la arginina o lisina en el constructo resto-espaciador que corresponde a la arginina o la lisina en la posición 3 o 7 (pero no ambas) de las secuencias consenso (i) y (ii) de los péptidos y las composiciones de la invención se citarán como Arg/Lys3 o Arg/Lys7, respectivamente.

- 5 En vista de lo anterior, la invención se refiere en general a moléculas en donde, Arg1 está unida a Arg5 a través de uno o más enlazadores químicos (que pueden consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos o pueden comprender tanto restos aminoacídicos como espaciadores/enlazadores químicos), en donde la distancia entre Arg1 y Arg5 es de  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando la molécula/constructo se encuentra en conformación extendida; Arg5 está unida además a Arg9 a través de uno o más enlazadores químicos (que pueden consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos o pueden comprender tanto restos aminoacídicos como espaciadores/enlazadores químicos), en donde la distancia entre Arg5 y Arg9 es de  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando la molécula/constructo se encuentra en conformación extendida. Los enlaces han de seleccionarse de tal forma que la molécula final Arg1-Arg5-Arg9 es una molécula lineal cuando se encuentra en conformación extendida. Las moléculas de la invención comprenden además o bien (1) una Arg/Lys3 dentro de los uno o más enlazadores químicos entre Ar1 y Arg5, en donde la distancia entre Arg1 y Arg/Lys3 cuando la molécula se encuentra en conformación extendida es de aproximadamente  $7,5 \pm 1,5$  Å; o (2) una Arg/Lys7 dentro de los uno o más enlazadores químicos entre Arg5 y Arg9, en donde la distancia entre Arg9 y Arg/Lys7 cuando la molécula se encuentra en conformación extendida es de aproximadamente  $7,5 \pm 1,5$  Å. Se ha de tener cuidado cuando se reemplazan uno o más restos con enlazadores químicos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, de tal forma que las cadenas laterales de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 retengan la misma presentación en 3D o una similar a sus cadenas laterales equivalentes en los péptidos y polipéptidos de las secuencias consenso (i) y (ii). Por lo tanto, las cadenas laterales de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 dentro del constructo resto-espaciador deben presentarse en una disposición lineal o prácticamente lineal dentro del espacio 3D cuando la molécula/constructo se encuentra en conformación extendida. Por lo tanto, Arg1 y Arg9 estarán separadas por  $25,8 \pm 3,0$  Å cuando la molécula/constructo se encuentra en posición extendida. En realizaciones preferidas, Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 son cada uno (i) un resto de L-aminoácido o (ii) un resto de D-aminoácido.

La invención se refiere de manera general a al menos una molécula aislada o a compuestos que comprenden o consisten en dicha molécula, en donde la molécula tiene una estructura consenso de acuerdo con uno cualquiera de (iii) a (vi) o las inversas de las mismas:

- (iii) Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (iv) Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (v) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>; o  
 (vi) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>

en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; en donde

- (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o  
 (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que

- (a) consiste en una cadena de péptido de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto de aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $12,9 \pm 1,5$  Å;

en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que

- (a) consiste en un solo resto de aminoácido que puede ser cualquier resto de aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5$  Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida;

y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico

- (a) en donde SP<sub>B</sub> y SP<sub>C</sub> representan cada uno un solo resto de aminoácido que puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) que separa los restos aminoacídicos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando el constructo se encuentra en conformación extendida.

Cuando se reemplaza uno o más restos aminoacídicos con un espaciador/enlazador químico en la secuencia consenso (i) o (ii) (es decir, para formar uno o más de las moléculas de acuerdo con las estructuras consenso (iii) a (vi)) se ha de tener cuidado para que las cadenas laterales de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 conserven la

misma presentación en 3D o una similar a sus cadenas laterales equivalentes en las secuencias consenso de péptido y polipéptido (i) y/o (ii). Por lo tanto, las cadenas laterales de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 dentro de constructos resto-espaciador de acuerdo con los métodos de la invención deben presentarse en una disposición lineal o prácticamente lineal en el espacio 3D cuando la molécula y/o el constructo se encuentra en conformación extendida.

5 En ciertas realizaciones, las estructuras consenso (iii) a (vi) de las moléculas de la invención no comprenden ningún espaciador/enlazador químico, sino que comprenden únicamente restos aminoácidos. En dichas realizaciones, la invención puede definirse como dirigida a al menos un péptido o polipéptido aislado y/o a compuestos que comprenden o que consisten en al menos un péptido o polipéptido aislado, teniendo dicho péptido o polipéptido una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las siguientes secuencias consenso (i) o (ii) o las inversas de las mismas:

- (i) Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>, o  
 (ii) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>

15 en donde,

(a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; y en donde el resto de aminoácidos X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que uno de X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, represente L-lisina o L-arginina;

o en donde,

(b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; y en donde el resto de aminoácidos X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que uno de X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, represente D-lisina o D-arginina.

La secuencia consenso (i), anterior, con las condiciones (a) es la SEQ ID NO: 17 y con las condiciones (b) es la SEQ ID NO: 19. La secuencia consenso (ii), anterior, con las condiciones (a) es la SEQ ID NO: 18 y con las condiciones (b) es la SEQ ID NO: 20.

En ciertas realizaciones, las estructuras consenso (iii) a (vi) de las moléculas de la invención comprenden enlazadores/espaciadores químicos para SP<sub>A</sub>, SP<sub>B</sub>, y SP<sub>C</sub> que no son y no comprenden restos aminoácidos. En dichas realizaciones, la invención puede definirse como dirigida a al menos un constructo resto-espaciador o a compuestos que comprenden o consisten en el mismo, en donde el constructo tiene una estructura consenso de acuerdo con uno cualquiera de (vii) a (x) o las inversas de las mismas:

- (vii) Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>B</sub>)-X-(CL<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (viii) Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>C</sub>)-X-(CL<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (ix) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>B</sub>)-X-(CL<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>; o  
 (x) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>C</sub>)-X-(CL<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>

en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1;

en donde

- (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o  
 (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos de aminoácidos adyacentes por 12,9 ± 1,5 Å; en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoácidos adyacentes por 7,5 ± 1,5 Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida;

y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoácidos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por 12,9 ± 1,5 Å cuando el constructo se encuentra en conformación extendida.

Cuando la molécula o el compuesto de la invención comprende uno o más espaciadores/enlazadores químicos que no están formados exclusivamente por restos aminoácidos, se ha de tener cuidado que las cadenas laterales de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 retengan la misma presentación en 3D o una similar a sus cadenas laterales equivalentes en las secuencias consenso de péptido y/o polipéptido (i) y/o (ii). Por lo tanto, las cadenas laterales de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 dentro de los constructos resto-espaciador de acuerdo con los métodos de la invención deben presentarse en una disposición lineal o prácticamente lineal dentro del espacio 3D cuando la molécula y/o el constructo se encuentra en conformación extendida.

Las moléculas y los compuestos descritos anteriormente de acuerdo con las secuencias consenso (iii) a (vi) (incluyendo ciertas realizaciones que comprenden solo restos aminoacídicos de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y/o que comprenden enlazadores químicos y restos aminoacídicos de acuerdo con las estructuras consenso (vii) a (x)) son particularmente útiles como grupos de transporte y/o de direccionamiento en las moléculas y compuestos descritos en el presente documento, reconociendo y/o uniéndose específicamente a proteoglucanos, por ejemplo, expresados sobre la superficie de una célula, en particular, uniéndose de manera selectiva al proteoglucano C4S frente a otros proteoglucanos. La porción de las secuencias consenso anteriores (iii) a (vi) que actúa como el grupo de direccionamiento que interactúa de manera específica con el proteoglucano C4S está representada por Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub> o Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub> (incluyendo las realizaciones específicas que tienen las secuencias o estructuras consenso de grupo de direccionamiento Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 21, en donde es un fragmento de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22, en donde es un fragmento de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20), Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>B</sub>)-X-(CL<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub> and Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>C</sub>)-X-(CL<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>) son moléculas idénticas respecto de la presentación en 3D de los restos aminoacídicos correspondientes a Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys<sub>3</sub> o Arg/Lys<sub>7</sub> y, en particular, las cadenas laterales de estos restos. Por consiguiente, se puede desarrollar cualquier molécula que comprenda 3 restos de arginina y un resto de lisina de acuerdo con las secuencias consenso (iii) a (vi) como grupo de direccionamiento de acuerdo con las siguientes reglas:

(1) Cada uno de los restos Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> han de ser el mismo isómero óptico de arginina, es decir, cada uno ha de ser una L-arginina o cada uno ha de ser una D-arginina.

(2) Arg<sub>1</sub> debe estar unida a Arg<sub>5</sub> usando uno o más espaciadores químicos (que pueden consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos o puede comprender tanto restos aminoacídicos como espaciadores/enlazadores químicos) de tal forma que están separados por  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida; Arg<sub>5</sub> debe estar unida además a Arg<sub>9</sub> usando uno o más espaciadores químicos (que pueden consistir exclusivamente en uno o más restos de aminoácidos o puede comprender tanto restos aminoacídicos como espaciadores/enlazadores químicos) de tal forma que también están separados por  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida.

(3) El grupo de direccionamiento también ha de comprender un resto de arginina o lisina en el enlace entre Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o entre Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> (pero no ambos) que sea de la misma quiralidad que la Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> (este resto corresponde al resto en la posición 3 o 7 (pero no ambos simultáneamente) en las secuencias consenso (i) y (ii) y el resto "X" en las secuencias consenso (iii) a (x)). En otras palabras, en los casos en los que Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> son L-arginina, la lisina/arginina ha de ser una L-lisina o una L-arginina; y en los casos donde Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> son D-arginina, la lisina/arginina ha de ser una D-arginina o una D-lisina.

(4) En los casos donde la lisina/arginina está posicionada en el enlace entre Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub>, está separada de Arg<sub>1</sub> por  $7,5 \pm 1,5$  Å; en los casos donde la lisina/arginina está posicionada en el enlace entre Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub>, está separada de Arg<sub>9</sub> por  $7,5 \pm 1,5$  Å.

(5) Los enlaces restantes pueden comprender cualquier espaciador o enlazador químico conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento (que puede consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos o puede comprender tanto restos aminoacídicos como espaciadores/enlazadores químicos) adecuados para mantener la separación necesaria de Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y X, así como adecuados para mantener una orientación en 3D y/o una presentación en 3D, de los aminoácidos y de sus cadenas laterales, similar o igual a aquella de los restos correspondientes en las secuencias consenso (i) y (ii). Los enlaces entre Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y X, preferentemente, no deben estar cargados positivamente. En los casos en los que los enlaces entre Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y X son restos aminoacídicos o comprenden restos aminoacídicos, los restos pueden ser cualquier D o L-aminoácido distinto de D o L-arginina o D o L-lisina.

En los casos donde las estructuras consenso de la invención consisten o comprenden exclusivamente aminoácidos, el grupo de direccionamiento tal como se ha descrito anteriormente puede diseñarse del siguiente modo. La secuencia del grupo de direccionamiento en las estructuras consenso (iii) a (vi), donde la estructura consiste en o comprende exclusivamente restos aminoacídicos, se representa por Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub> (véanse, por ejemplo, las secuencias consenso (i) y (ii)). La estructura cumple la regla (2) anterior. Es decir, el enlace que separa a Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> y que separa a Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando la molécula se encuentra en la conformación extendida que la separa es un péptido que consiste en 3 restos aminoacídicos. Las reglas descritas inmediatamente antes tal como se aplican además a la secuencia consenso del péptido son:

(P1) Cada uno de los restos Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> han de ser el mismo isómero óptico de arginina, es decir, cada uno ha de ser una L-arginina o cada uno ha de ser una D-arginina (correspondiente a la regla (1) anterior).

(P2) El resto X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub> (pero no ambos) es una lisina o arginina con la misma quiralidad que Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub>. Es decir, en los casos en los que Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> son L-arginina, X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub> (pero no ambos) han de ser una L-lisina o una L-arginina; y en los casos donde Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> son D-arginina, X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub> (pero no ambos) han de ser una D-arginina o una D-lisina (correspondiente a la regla 3 y 4 anterior).

(P3) Los demás restos, es decir, X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>8</sub> y X<sub>3</sub> (donde X<sub>7</sub> se selecciona de acuerdo con la regla P2 inmediatamente anterior) o X<sub>7</sub> (donde X<sub>3</sub> se selecciona de acuerdo con la regla P2 inmediatamente anterior) puede ser un aminoácido distinto de L o D-arginina o L o D-lisina.

Para todas las moléculas y compuestos de la invención, es decir, que comprenden o consisten en cualquiera de las secuencias consenso (iii) a (vi) (incluyendo las realizaciones (i), (ii) y (vii) a (x)) se prefiere además, pero no es

necesario, que LD-10 o LD-1 represente un L o D-aminoácido distinto de L o D-arginina o L o D-lisina y que XD-11 o XD-2 represente un D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina. Se prefiere especialmente que LD-10 o LD-1 represente L o D-histidina y que XD-11 o XD-2 represente D-histidina.

- 5 En los casos donde las estructuras consenso de la invención consisten o comprenden exclusivamente aminoácidos (es decir, corresponden a las secuencias consenso (i) o (ii)), se prefiere, pero no es necesario, que esté presente un D-aminoácido en la posición 4 o en la posición 6, es decir, en X<sub>4</sub> o X<sub>6</sub>. En realizaciones preferidas adicionales, las "posiciones libremente seleccionables", es decir, 2, 4, 6, 8 y 3 (donde la posición 7 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b), anterior, como una D o L-lisina o D o L-arginina) o 7 (donde la posición 3 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b), anterior, como una D o L-lisina o D o L-arginina) se seleccionan cada una independientemente entre los aminoácidos fenilalanina, triptófano, valina, metionina, isoleucina y leucina. También se prefiere que no más de tres de las posiciones libremente seleccionables sean restos de alanina. Adicionalmente, se prefiere que ninguna de las posiciones libremente seleccionables sea un resto de prolina.
- 10
- 15 Los ejemplos no limitantes de péptidos que pueden usarse de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento y, en particular, tal como se han definido anteriormente en el presente documento, se proporcionan en la tabla 1.

Tabla 1

Péptidos ejemplares de la invención*	
RSTqRYRVRh	(SEQ ID NO:1)
RYFvRIKYRh	(SEQ ID NO:2)
RYFvRIKARh	(SEQ ID NO:3)
RAAvRAKYRh	(SEQ ID NO:4)
RAAvRIKYRh	(SEQ ID NO:5)
RSTgRYRVRh	(SEQ ID NO:6)
RSTqRYKVRh	(SEQ ID NO:7)
RGGgRGKGRh	(SEQ ID NO:8)
RHHhRHKHRh	(SEQ ID NO:9)
RVVvRVKVRh	(SEQ ID NO:10)
RLLIRLKLRLh	(SEQ ID NO:11)
RMMmRMKMRh	(SEQ ID NO:12)
RllIRIKIRh	(SEQ ID NO:13)
RYFvRIKYRh	(SEQ ID NO:25)
RSTqRYRVR	(SEQ ID NO:26)
RYFvRIKYR	(SEQ ID NO:15)
RYFvRIKAR	(SEQ ID NO:27)
RAAvRAKYR	(SEQ ID NO:28)
RAAvRIKYR	(SEQ ID NO:29)
RSTqRYRVR	(SEQ ID NO:30)
RSTqRYKVR	(SEQ ID NO:31)
RGGgRGKGR	(SEQ ID NO:32)
RHHhRHKHR	(SEQ ID NO:33)
RVVvRVKVR	(SEQ ID NO:34)
RLLIRLKLRL	(SEQ ID NO:35)
RMMmRMKMR	(SEQ ID NO:36)

Péptidos ejemplares de la invención*	
RIIRIKIR	(SEQ ID NO:37)
RYFVRIKYR	(SEQ ID NO:14)
RYFVRiKYR	(SEQ ID NO:16)
la minúscula indica un enantiómero D; la mayúscula indica un enantiómero L	

Además de los péptidos, polipéptidos y compuestos que comprenden o consisten en los péptidos de acuerdo con las secuencias consenso (i) o (ii), la invención abarca además variantes de las secuencias de péptido ejemplificadas explícitamente divulgadas en el presente documento. Dichas variantes comprenden la sustitución de las posiciones libremente seleccionables, es decir, la sustitución en las posiciones 2, 4, 6, 8 y 3 (donde la posición 7 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b), anterior, como una D o L-lisina o D o L-arginina) o 7 (donde la posición 3 se define/selecciona de acuerdo con la regla (b), anterior, como una D o L-lisina o una D o L-arginina), con una sustitución de aminoácidos conservativa. Como es bien sabido en la técnica, las "sustituciones conservativas" son sustituciones por otro aminoácido que tenga características similares, por ejemplo, aminoácidos pequeños sustituidos por aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos sustituidos por aminoácidos ácidos, etc., para cualquier clase característica de aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos. Sustituciones preferidas para un resto particular de acuerdo con la presente invención pueden ser seleccionadas de entre los otros miembros de su grupo de sustitución conservativa. Se reconocen comúnmente en la técnica seis grupos de sustitución conservativa: (1) alanina (A), glicina (G) serina (S) y treonina (T); (2) ácido aspártico (D) y ácido glutámico(E); (3) asparagina (N) y glutamina (Q); (4) arginina (R), histidina (H) y lisina (K); (5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M) y valina (V); y (6) fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Sin embargo, las sustituciones en las posiciones libremente seleccionables de cualquier secuencia de péptido de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) divulgadas de manera expresa en el presente documento no tienen por qué efectuarse con un miembro de su grupo de sustitución conservativa. La invención también abarca la sustitución de cualquier resto en una posición libremente seleccionable, es decir, 2, 4, 6, 8 y 3 (donde la posición 7 se define/selecciona de acuerdo con la regla (P2) anterior, como una D o L-lisina o D o L-arginina) o 7 (donde la posición 3 se define/selecciona de acuerdo con la regla (P2) anterior, como una D o L-lisina o una D o L-arginina), por cualquier otro L o D-aminoácido distinto de L o D-arginina o L o D-lisina sujeto a las reglas de las secuencias consenso indicadas en el presente documento. Tal como se detalla en el presente documento, las posiciones no definidas no contribuyen sustancialmente a los efectos de direccionamiento.

En todas las realizaciones de la invención, el uso del aminoácido prolina (P) en cualquiera de las secuencias consenso (i) a (x), por ejemplo, en cualquiera de los enlazadores/espaciadores químicos definidos en el presente documento, debe evitarse, ya que se cree que este resto podría destruir o distorsionar suficientemente la conformación en 3 dimensiones de la molécula o el péptido, de tal forma que se reduce significativamente la actividad o afinidad de unión.

Cualquier enlazador químico o espaciador químico adecuado para mantener el espaciado y la orientación/presentación en 3D relativa de los 3 restos de arginina (es decir, Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub>) y la una arginina o lisina (es decir, Arg/Lys<sub>3</sub> o Arg/Lys<sub>7</sub>, pero no ambas) equivalente a los restos correspondientes en las secuencias consenso (i) y (ii) conocidas en la técnica o descritas en el presente documento, puede ser usado en la construcción de las moléculas de la invención de acuerdo con las estructuras consenso (iii) a (vi) (incluyendo las realizaciones que tienen cualquiera de las estructuras consenso (vii) a (x)). Ejemplos no limitantes de enlazadores/espaciadores químicos adecuados incluyen péptidos beta y gamma; estructuras basadas en azúcar-aminoácidos; peptidomiméticos en horquilla beta; miméticos en hélice alfa, miméticos y lámina beta/hebra beta y miméticos en giro beta (y ciclótidos). En realizaciones preferidas, los enlazadores/espaciadores químicos no están cargados positivamente. Los enlazadores deben someterse a degradación metabólica, no ser tóxicos (incluyendo metabolitos) y no deben reducir significativamente la solubilidad de los compuestos de la invención.

Se contempla expresamente que las realizaciones descritas a lo largo de la presente solicitud, ya se identifiquen como preferidas (incluyendo más preferidas) o no, pueden implementarse de manera independiente y/o pueden combinarse con las otras realizaciones divulgadas en el diseño o la selección de un péptido de la invención. Por lo tanto, una secuencia o estructura del grupo de direccionamiento del péptido, polipéptido, molécula o compuesto de la invención ha de cumplir las reglas (1) a (5) listadas anteriormente y opcionalmente, puede no cumplir ninguna o cumplir una o más de una de las condiciones indicadas en las otras realizaciones divulgadas en el presente documento, ya sean preferidas o no.

La invención puede comprender las moléculas y compuestos aislados (incluyendo moléculas, péptidos, polipéptidos y compuestos aislados que comprenden o consisten en las moléculas, péptidos y/o polipéptidos) de acuerdo con las secuencias consenso (iii) a (vi) (incluyendo realizaciones de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y las estructuras consenso (vii) a (x)) y puede comprender adicionalmente un grupo biológicamente activo (BAM; también citado como la "carga" del grupo de direccionamiento). El constructo (BAM)-(grupo de direccionamiento) también



puede denominarse un conjugado de BAM de la invención a lo largo de la divulgación. El BAM puede conjugarse químicamente a los compuestos, péptidos, polipéptidos y/o moléculas de la invención de manera directa y/o pueden unirse a los mismos a través de un grupo enlazador.

5 Tal como se usa a lo largo de la presente divulgación, conjugación directa indica la conjugación del grupo de BAM a cualquier resto aminoacídico dentro de las secuencias consenso (iii) a (vi) (incluyendo realizaciones de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y las estructuras consenso (vii) a (x)) o a cualquier resto aminoacídico o grupo químico adecuado del mismo, usando cualquier acoplamiento químico conocido en la técnica o descrito en el presente documento, adecuado para la conjugación del grupo BAM a un resto aminoacídico (por ejemplo, una cadena lateral de aminoácido) y/o grupo químico. Por consiguiente, el acoplamiento directo puede dar como resultado uno o más grupos químicos espaciados entre el grupo BAM y el aminoácido (por ejemplo, cadena lateral de aminoácido) o grupo químico del constructo resto-espaciador, formándose dichos grupos como resultado de la reacción de acoplamiento, tal como se conoce en la técnica.

15 Como alternativa, tal como se describe en el presente documento, el grupo BAM puede estar conjugado a cualquier resto aminoacídico o grupo químico dentro de las secuencias consenso (iii) a (vi) (incluyendo realizaciones de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y las estructuras consenso (vii) a (x)), de manera indirecta, es decir, a través de un grupo enlazador. Por lo tanto, tal como se usa a lo largo de la presente divulgación, la conjugación indirecta significa que el BAM está conjugado al resto enlazador, estando conjugado dicho grupo enlazador a un resto aminoacídico u otro grupo químico dentro de una secuencia consenso, tal como se define en el presente documento. La conjugación entre el BAM y el grupo enlazador y entre el grupo enlazador y un resto aminoacídico o grupo químico de las secuencias consenso (iii) a (vi) (incluyendo realizaciones de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y las estructuras consenso (vii) a (x)), puede ser cualquier método de conjugación y/o compuesto adecuado para efectuar dicha conjugación, tal como se describe en el presente documento o tal como se conoce de otro modo en la técnica.

25 La conjugación directa o indirecta del grupo BAM puede dirigirse a cualquier resto aminoacídico o grupo enlazador/espaciador químico dentro de las moléculas de la invención. Por lo tanto, el grupo BAM puede estar conjugado directa o indirectamente a un resto aminoacídico que se encuentra en el extremo N o C de la secuencia consenso (iii) a (vi) (incluyendo realizaciones de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y las estructuras consenso (vii) a (x)). Como alternativa o adicionalmente, el grupo BAM puede estar conjugado directa o indirectamente a un resto aminoacídico interno o a un grupo enlazador/espaciador químico dentro de las moléculas de la invención. Tal como se usa a lo largo de la presente divulgación, un resto interno o un grupo químico interno se refiere a un resto aminoacídico o grupo químico de secuencia consenso (iii) a (vi) (incluyendo realizaciones de acuerdo con las secuencias consenso (i) y (ii) y las estructuras consenso (vii) a (x)) que no se encuentra en el extremo de la cadena de péptido lineal o constructo resto-espaciador lineal. Tal como se conoce en la técnica, los métodos de conjugación (ya sean directos o indirectos) pueden necesitar de la modificación química de uno o ambos sitios de conjugación (por ejemplo, modificación de un resto aminoacídico, modificación de un grupo químico dentro de la molécula de la invención y/o modificación del grupo BAM). Por consiguiente, la presente invención también abarca la modificación química de las moléculas de la invención, los compuestos que comprenden o consisten en las moléculas y/o los componentes del conjugado.

En realizaciones preferidas, los compuestos de la invención comprenden o consisten en un conjugado peptídico, por ejemplo, un conjugado de BAM, que tiene un BAM conjugado en el extremo de una secuencia o estructura consenso (i) a (x) tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en estas realizaciones preferidas, el conjugado de BAM tiene una estructura consenso de acuerdo con las siguientes estructuras consenso (xi) a (xiv) o las inversas de las mismas:

(xi) (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (xii) (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 50 (xiii) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM); o  
 (xiv) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM)

(BAM) representa un grupo biológicamente activo; en donde (ENLACE) representa un grupo enlazador opcional; en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido y m tiene un valor de 0 o 1; en donde

(a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o  
 (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

60 en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que

(a) consiste en una cadena de péptido de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 65 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por 12,9 ± 1,5 Å;

en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que

(a) consiste en un solo resto aminoacídico que puede ser cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o

5 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$  cuando la molécula se encuentra en conformación extendida;

y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico

10 (a) en donde SP<sub>B</sub> y SP<sub>C</sub> representan cada uno un solo resto aminoacídico que puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o

(b) que separa los restos de aminoácido adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$  cuando el constructo se encuentra en conformación extendida.

15 Las secuencias consenso (xi) a (xiv) son idénticas a las secuencias consenso (iii) a (vi), respectivamente, salvo por la presencia del grupo BAM y del grupo enlazador opcional, (ENLACE). Por lo tanto, la selección de los espaciadores químicos (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>), que pueden consistir o comprender exclusivamente de restos aminoacídicos o comprender tanto enlazadores químicos como restos aminoacídicos tal como se describe en el presente documento) se produce tal como se describe en el presente documento respecto a las secuencias consenso (iii) a (vi), incluyendo

- 20
- selección de estos espaciadores químicos para que consistan en o comprendan exclusivamente de restos aminoacídicos de acuerdo con las realizaciones (y combinaciones de las mismas) de las secuencias consenso (i) y (ii) tal como se detallan a lo largo de la presente divulgación y
  - selección de estos espaciadores químicos para que comprendan tanto enlazadores químicos como restos aminoacídicos de acuerdo con las realizaciones (y combinaciones de las mismas) de las estructuras consenso (vi)
- 25 a (x) tal como se detalla a lo largo de la presente divulgación.

En los casos donde está presente un grupo enlazador, (por ejemplo (ENLACE) en las estructuras consenso (xi) a (xiv)) y/o un grupo enlazador usado en el enlace indirecto del BAM a un resto aminoacídico o a un grupo enlazador químico en cualquiera de las secuencias/estructuras consenso (i) a (x), dicho enlazador puede ser cualquier enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico conocido en la técnica o divulgado en el presente documento, adecuado para unir el BAM al grupo de direccionamiento restante. El BAM puede estar conjugado químicamente al grupo enlazador o, por ejemplo, en los casos donde tanto el grupo enlazador (por ejemplo, ENLACE) de las estructuras (xi) a (xiv)) y el BAM son péptidos o polipéptidos, el BAM puede unirse al grupo enlazador a través de un enlazador peptídico y el grupo enlazador también pueden estar unido al grupo de direccionamiento de la secuencia/estructura consenso a través de un enlace peptídico. Ejemplos no limitantes de grupos enlazadores incluyen enlazadores peptídicos, por ejemplo, que comprenden uno o más restos de ácido glutámico, glicina, serina, cisteína y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el grupo enlazador (ENLACE) de las estructuras (xi) a (xiv) es un solo aminoácido que es ácido L o D-glutámico.

40 La invención también abarca moléculas y compuestos que comprenden o consisten en las moléculas, por ejemplo, conjugados peptídicos/conjugados resto-espaciador/conjugados de BAM, que no comprenden un grupo enlazador, es decir, las estructuras consenso (xi) a (xiv) que carecen del resto (ENLACE) y/o enlace directo del grupo BAM a cualquier resto aminoacídico o grupo químico dentro de cualquier secuencia/estructura consenso (i) a (x). En los casos donde el conjugado de BAM de la invención carezca del grupo enlazador, el BAM puede estar conjugado, por ejemplo, conjugado químicamente, de manera directa al resto aminoacídico o grupo químico de las moléculas (por ejemplo, un grupo químico del enlazador químico). Ejemplos no limitantes de dicha conjugación química incluyen la unión covalente a la molécula en el extremo N-terminal y/o al resto aminoacídico N-terminal a través de un enlace de amida o al extremo C-terminal y/o al resto de aminoácido C-terminal a través de un enlace éster. En los casos donde el BAM es un péptido o polipéptido, el BAM puede estar conjugado directamente al extremo N-terminal y/o al aminoácido N-terminal o al extremo C-terminal y/o al aminoácido C-terminal a través de un enlace peptídico.

La invención abarca cualquier BAM que se espera que pueda ejercer una actividad terapéuticamente relevante tras su administración a un organismo o tras su suministro a una o más células de un organismo, *in vitro* o *in vivo*. Por consiguiente, ejemplos no limitantes de BAM abarcados por la invención incluyen mono y polisacáridos, agentes citotóxicos, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes antivíricos, agentes antibacterianos y agentes para el tratamiento de infecciones por protozoos. El BAM también puede ser una desoxirribosa o una ribosa.

Ejemplos no limitantes de agentes antineoplásicos que pueden usarse como BAM de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, abiraterona, arsénico, axitinib, azacitidina, bendamustina, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfán, cabazitaxel, calusterona, capecitabina, carboplatino, carfilzomib, carmustina, carmustina, celecoxib, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, actinomicina D, dasatinib, daunorrubicina, decitabina, dextrazoxano, docetaxel, doxorubicina, entinostat, epirubicina, eribulina, erlotinib, estramustina, etopósido, everolimus, exemestano, fostamatinib, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, lenalidomida, ifosfamida, imatinib, iomustina, irinotecán,

isotretinoína, ixabepilona, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, levamisol, lomustina, CCNU, marizomib, mecloretamina, mostaza de nitrógeno, melfalán, L-PAM, mercaptopurina, 6-MP, mertansina, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nandrolona, nelarabina, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pazopanib, pegademasa, pemetrexed, pentostatina, pipobromano, plerixafor, plicamicina, mitramicina, porfímero, pralatrexato, procarbazona, quinacrina, rapamicina, romidepsin, ruxolitinib, sorafenib, estreptoizocina, sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, VM-26, testolactona, talidomida, tioguanina, 6-TG, tiotepa, topotecán, toremifeno, tretinoína, ATRA, mostaza de uracilo, valrubicina, vandetanib, vemurafenib, verteporfina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vismodegib, vorinostat, zoledronato, análogos de nucleósido AZT, b-D-arabinofuranosa, vidarabina, 2-clorodeoxiadenosina, fármacos intercalantes, inhibidores de quinasa, cofarabina, laromustina, clofosfamida, asparaginasa, dexametasona, prednisona y lestaurtinib. Los agentes antineoplásicos anteriormente listados pueden usarse de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento, no solo en relación con las enfermedades neoplásicas, sino también en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de otras enfermedades o síntomas de las mismas, tal como se conoce en la técnica, por ejemplo, en relación con el tratamiento, la prevención y/o la mejora de enfermedades antiinflamatorias o autoinmunitarias y/o síntomas de las mismas.

Ejemplos de agentes antiinflamatorios que pueden usarse como BAM de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de COX-2, prednisona, pazopanib, famotidina, dalfampridina, pegloticasa, esomeprazol, aspirina, celecoxib, diclofenaco, valdecoxib, rofecoxib, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, sulindaco, tolmetina, lansoprazol, meclofenamato, triamcinolona, metilprednisolona, betametasona, budesonida, prednisolona, hidrocortisona, dexametasona y cortisona.

Ejemplos de agentes anti-protozoos que pueden usarse como BAM de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cloroquina, mefloquina, primaquina, clorhidrato de proguanilo, clorhidrato de proguanilo con atovaquona, pirimetamina, sulfadoxina, quinina, quinolina, doxiciclina, clindamicina, artesunato, diloxanida, metronidazol, tinidazol, clorhidrato de mepacrina, anfotericina, pentamidina, pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, atovaquona, trimetoprima-sulfametoxazol, trimetoprima, dapsona, atovaquona, isetionato de pentamidina, amodiaquina, cloroguanida, eflornitina, hidroxicloroquina, yodoquinol, antimonio de meglumina, melarsoprol, nifurtimox, paromomicina, estibogluconato de sodio, suramina y triparsamida.

Tal como se detalla en el presente documento, los compuestos de la invención comprenden o consisten en un conjugado de BAM (es decir, un BAM conjugado al grupo de direccionamiento; también denominado como un conjugado peptídico) que puede efectuar el transporte intracelular del BAM. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, la invención abarca una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, por ejemplo, un conjugado de BAM y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden, por ejemplo, el conjugado de BAM, pueden usarse para cualquier indicación que se sepa que o se prediga que puede ser tratada con el BAM. Por ejemplo, en los casos donde el BAM es un agente antivírico, puede usarse la composición farmacéutica que comprende el conjugado de BAM en el tratamiento de una infección vírica o los síntomas de la misma, incluyendo, pero no se limitan a, VIH; virus de Epstein Barr; morbillivirus; paramyxovirus; rubivirus; virus del herpes; virus del dengue; virus del herpes simple; parvovirus; virus sincitial respiratorio; virus variola; varicela; flavivirus; virus linfotrópico T humano; virus de la hepatitis A, B, C, D o E, virus de Lassa y/o virus de la gripe. En los casos donde el BAM es un agente contra protozoos, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de BAM puede usarse en el tratamiento de infecciones por protozoos, tales como leishmaniasis y/o malaria.

Los grupos de direccionamiento de las secuencias/estructuras consenso (i) a (xiv) interactúan de manera específica con proteoglicanos, en particular, condroitín-4-sulfato (C4S). C4S se expresa preferencialmente en conexión con ciertos marcadores de la superficie celular, por ejemplo, CD68 y se expresa preferencialmente, en relación con otros proteoglicanos, por ciertos tipos celulares, por ejemplo, leucocitos y mielocitos. Por consiguiente, la invención abarca el uso de las moléculas y los compuestos, por ejemplo, conjugados de BAM, para dirigirse de manera específica a células que expresan CD68 y/o C4S. La invención abarca el uso de las moléculas y los compuestos, por ejemplo, conjugados de BAM, para facilitar el transporte del resto de BAM al interior de células que expresan CD68 y/o C4S, tales como mielocitos y leucocitos.

Las moléculas y compuestos de la invención (incluyendo moléculas aisladas de péptidos, polipéptidos y compuestos que comprenden o consisten en cualquiera de las secuencias consenso (i) a (xiv)) son particularmente útiles para dirigirse a leucocitos y/o mielocitos y, por lo tanto, pueden ser particularmente útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de los síntomas asociados con enfermedades o afecciones en las que los leucocitos tienen una implicación fisiopatológica. Ejemplos no limitantes de dichas enfermedades o afecciones incluyen neutrofilia, neutropenia, leucopenia, basopenia, basofilia, eosinopenia, eosinofilia, síndrome hipereosinófilo idiopático, leucocitosis linfocítica, linfocitosis, linfocitopenia, monocitosis, monocitopenia, anomalía de May Hegglin, anomalía de Pelger-Huet, anomalía de Alder-Reilly, síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Job (hiper-IgE), síndrome de los leucocitos perezosos, deficiencia de C3 congénita, enfermedad granulomatosa crónica, leucocitos, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiencia benigna de mieloperoxidasa, enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa, síndrome de DiGeorge, síndrome de Nezelof, agammaglobulinemia infantil ligada al sexo, hipogammaglobulinemia variable común, mucopolisacaridosis, lipidosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad

de Fabry, enfermedad de Farber, gangliosidosis; Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Wolman, leucemia, leucemia linfocítica aguda (L1, L2, L3), leucemia linfocítica crónica, todas las formas de leucemia mielógena aguda (AML), incluyendo AML no diferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica, (M2), leucemia promielocítica, (M3), leucemia mielocítica (M4), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica, (M7), leucemia mielógena crónica, así como leucemias agudas no diferenciadas o bifenotípicas (leucemias que tienen características tanto linfocíticas como mieloides) y todas las formas de linfomas, incluyendo linfoma de Hodgkin, linfoma de linfocitos T, linfoma de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple y linfoma folicular.

#### 10 4. Definiciones

La expresión "enfermedades o afecciones en las que los leucocitos tienen una implicación fisiopatológica" y frases análogas tal como se usan en el presente documento se refiere a: i) afecciones, donde la etiología de la enfermedad se encuentran principalmente en las células mieloides o linfoides, tales como transformaciones malignas, incluyendo todas las formas de leucemia, así como trastornos de leucocitos no malignos, incluyendo trastornos genéticos de la función de leucocitos; ii) trastornos secundarios de la función de leucocitos resultantes de la exposición a tóxicos o resultantes de infecciones víricas, bacterianas, por protozoos u otras infecciones parasitarias de los leucocitos; o iii) gracias a la implicación ubicua de los leucocitos en la inflamación y la respuesta inmunitaria en general, tal como en enfermedades y afecciones o síntomas de las mismas, que no están causadas ni primaria ni secundariamente por leucocitos, pero que pueden tratarse, prevenirse, atenuarse o mejorarse modulando (estimulando o inhibiendo) la actividad de los leucocitos.

La expresión "derivados químicos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la modificación (química) de aminoácidos, cadenas laterales de aminoácidos y enlaces peptídicos (incluyendo aquellos en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal, dentro de la cadena principal de la estructura/secuencia consenso), así como la modificación de cualquier grupo químico dentro del espaciador/enlazador químico de las estructuras consenso (iii) a (xiv). El término no pretende referirse a cualquier adición, sustitución o eliminación de restos aminoacídicos en una cadena de aminoácidos o peptídica. Los derivados químicos de los L-aminoácidos o de los aminoácidos L-enantioméricos comprenden normalmente cualquier derivado de origen natural o no natural de estos aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, aminoácidos, tal como se han definido anteriormente, que comprenden modificaciones postraduccionales o modificaciones sintéticas, incluyendo acetilación (en el extremo N-terminal de la secuencia de (poli) péptido, en los restos de lisina, etc.), desacetilación, alquilación, tal como metilación, etilación, etc. (preferentemente en restos de lisina o arginina dentro de la secuencia de (poli) péptido), desalquilación, tal como desmetilación, desetilación, etc., amidación (preferentemente, en el extremo C-terminal de la secuencia de (poli) péptido), formilación, gamma-carboxilación, glutamilación, glucosilación (preferentemente en restos de asparagina, lisina, hidroxilisina, serina o treonina, etc., dentro de la secuencia de (poli) péptido), adición de un grupo hemo, hidroxilación, yodación, isoprenilación de un resto de isoprenoide, tal como farnesilo o geranylgeraniol, etc.), lipoilación (unión de funcionalidad lipoato), tal como prenilación, formación de un anclaje de GPI, incluyendo miristoilación, farnesilación, geranylgeranilación, etc., oxidación, fosforilación (por ejemplo, en un resto de serina, tirosina, treonina o histidina, etc., dentro de la secuencia de (poli) péptido), sulfatación (por ejemplo, de la tirosina), selenoilación, sulfatación, etc. Los derivados químicos de los aminoácidos también incluyen, pero sin limitarse a los mismos, aminoácidos modificados, que han sido modificados mediante la introducción de un marcador, incluyendo marcadores radiactivos, un colorante o un grupo fluorescente o un grupo quimioluminiscente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "posiciones libremente seleccionables", "aminoácidos libremente seleccionables" y términos análogos, se refiere a las posiciones dentro del grupo de direccionamiento de las realizaciones que abarcan las secuencias consenso (i) y (ii) que no se definen explícitamente. El grupo de direccionamiento de las secuencias consenso (i) y (ii) se representa por Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>, en donde Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D o L-arginina (todos con la misma quiralidad) y en donde los aminoácidos restantes X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, sea una lisina o arginina que tiene la misma quiralidad que Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub>. Por lo tanto, hay 5 posiciones libremente seleccionables de las secuencias consenso (i) y (ii), que son X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>8</sub> y o bien X<sub>3</sub> (donde la posición X<sub>7</sub> se define/selecciona como una D o L-lisina o una D o L-arginina) o bien X<sub>7</sub> (donde la posición 3 se define/selecciona como una D o L-lisina o una D o L-arginina). Tal como se define adicionalmente en el presente documento, la invención también abarca el reemplazo de los aminoácidos libremente seleccionables por espaciadores químicos (que también pueden incluir restos de aminoácido) para formar los constructos resto-espaciador, de tal forma que la orientación en 3D relativa de las tres argininas y una lisina o arginina es equivalente a la de Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys en la posición 3 o 7 (pero no en ambas) de las secuencias consenso (i) y (ii) (es decir, denominado un constructo resto-espaciador en todo el documento). Los espaciadores/enlazadores químicos que pueden reemplazar al aminoácido libremente seleccionable en las moléculas de la invención (por ejemplo, un constructo resto-espaciador) se presentan mediante (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en las estructuras consenso (iii) a (vi) y (xi) a (xiv) y mediante (CL<sub>A</sub>), (CL<sub>B</sub>) y (CL<sub>C</sub>) en las estructuras consenso (vii) a (x).

En el contexto de la presente invención, los L-aminoácidos, también conocidos en la técnica y citados en el presente documento como aminoácidos L-enantioméricos, son preferentemente aminoácidos seleccionados entre aminoácidos de origen natural o sus derivados. Los aminoácidos de origen natural se reconocen como los aminoácidos

convencionales (proteínogénicos) alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina, pero también incluyen aminoácidos no convencionales, tales como ornitina, citrulina, homocisteína, S-adenosilmetionina, hidroxiprolina, selenocisteína, pirrolisina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina y ácido gamma-aminobutírico.

De forma similar, en el contexto de la presente invención, los D-aminoácidos, también conocidos en la técnica y citados en el presente documento como aminoácidos D-enantioméricos, son preferentemente "retro-inverso" aminoácidos no naturales (no proteínogénicos), en donde estos "retro-inverso" aminoácidos no naturales (no proteínogénicos) proceden de L-aminoácidos de origen natural y/o de sus derivados, tal como se han definido anteriormente. En este contexto, la expresión "retro-inverso" se refiere a un isómero de un L-aminoácido de origen natural tal como se ha definido anteriormente (y péptidos formados a partir de los mismos) en los que se invierte la quiralidad del resto de L-aminoácido de origen natural en el D-aminoácido correspondiente. En otras palabras, en los enlaces peptídicos de los D-aminoácidos, se intercambian las posiciones de los grupos carbonilo y amino, mientras que se conserva la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono alfa. Por consiguiente, pueden insertarse D-aminoácidos en una secuencia de péptido que consiste en o comprende L-aminoácidos y por lo tanto, puede conjugarse con L-aminoácidos tal como se ha definido anteriormente mediante métodos conocidos en la técnica o definidos en el presente documento.

Las abreviaturas de aminoácidos usadas en la presente divulgación se muestran en la tabla de correspondencia a continuación. Tal como se usa a lo largo de la presente divulgación y tal como se detalla en la tabla siguiente, una letra mayúscula en la letra 1 del símbolo se refiere a un L-aminoácido, mientras que una letra minúscula en la letra 1 del símbolo se refiere a un D-aminoácido.

Símbolo			Aminoácido
1-Letra		3-Letras	
L-aminoácido	D-aminoácido		
A	a	Ala	Alanina
R	r	Arg	Arginina
N	n	Asn	Asparagina
D	d	Asp	Ácido aspártico
C	c	Cys	Cisteína
E	e	Glu	Ácido glutámico
Q	q	Gln	Glutamina
G	g	Gly	Glicina
H	h	His	Histidina
I	i	Ile	Isoleucina
L	l	Leu	Leucina
K	k	Lys	Lisina
M	m	Met	Metionina
F	f	Phe	Fenilalanina
P	p	Pro	Prolina
S	s	Ser	Serina
T	t	Thr	Treonina
W	w	Trp	Triptófano
Y	y	Tyr	Tirosina
V	v	Val	Valina
X	x	Xaa	Desconocido u otro

El término "leucocitos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de glóbulo blanco tal

como se define en el presente documento o como se conoce en la técnica. El término también abarca células precursoras y/o diferentes estadios del desarrollo de los glóbulos blancos. El término "leucocito" incluye típicamente granulocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y/o células de la microglía. Los granulocitos incluyen, pero no se limitan a, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los linfocitos incluyen, pero no se limitan a, linfocitos NK, linfocitos T colaboradores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T  $\gamma\delta$  y linfocitos B.

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptidos", "polipéptidos" y "proteínas" tienen su significado como se entiende generalmente en la técnica, es decir, se refiere a una cadena de aminoácidos. Sin embargo, los términos no han de interpretarse como limitantes de la longitud de la cadena de aminoácido.

## 5. Breve descripción de las figuras

**Figura 1** Representación del péptido TAT (molécula de la izquierda) y C4S (molécula de la derecha) en conformación extendida, que indica las distancias calculadas entre ciertos grupos químicos de acuerdo con predicciones de modelo.

**Figura 2** Representación tridimensional del modelado de la interacción entre los grupos de direccionamiento (es decir, el péptido de 9 componentes) de acuerdo con la invención (molécula de la izquierda) y el proteoglucano de C4S (molécula de la derecha).

**Figura 3** Representación esquemática de la interacción entre C4S y el péptido de direccionamiento de la invención.

**Figura 4** Unión de un péptido de la invención que tiene la secuencia RYFvRIKYRh ("RYF") a diversos proteoglucanos (4A) en comparación con la unión del péptido TAT (4B); HS: heparán sulfato; C4S: condroitín-4-sulfato; C6S: condroitín-6-sulfato; HA: ácido hialurónico. El péptido RYF de la invención se une específica y selectivamente a C4S frente a otros proteoglucanos.

**Figura 5** Unión de los péptidos de acuerdo con la invención a C4S. Las letras en mayúsculas indican L-enantiómeros y las letras en minúscula indican D-enantiómeros. La unión a C4S se mantiene únicamente en los casos en los que todas las posiciones 1, 5, 9 y 3 o 7 tienen la misma quiralidad.

**Figura 6** Unión de los péptidos de acuerdo con la invención a C4S. Las letras en mayúsculas indican L-enantiómeros y las letras en minúscula indican D-enantiómeros. La unión selectiva a C4S frente a la unión a los proteoglucanos heparina e hialuronato se correlaciona con una carga negativa reducida del péptido.

**Figura 7** Imágenes de microscopía de luminiscencia LUMASCOPE™ de células CHO que expresan C4S y células Sog9 deficientes en C4S incubadas previamente con un péptido de la invención marcado con FITC: RYFvRIKYRh ("RYF"; SEQ ID NO: 2). RYF no logró unirse a las células Sog9, que carecían de expresión de C4S.

**Figura 8** Imágenes de microscopía de fluorescencia LUMASCOPE™ de esta unión de un péptido de la invención marcado con FITC: RYFvRIKYRh ("RYF"; SEQ ID NO: 2) a macrófagos preincubados durante 16 horas con clorato 0, 3, 10 o 30  $\mu\text{M}$ , un inhibidor de las sulfotransferasas (y por lo tanto, de la expresión de C4S). La unión de RYF se redujo con la reducción de la expresión de C4S.

**Figura 9** Datos de expresión génica de CHST11 procedentes de las matrices Atlas.

**Figura 10** Liberación de FITC conjugado en posición N-terminal a partir de péptidos de la invención tras la exposición a extractos de macrófago. Los péptidos 1, 5 y 6 tienen la secuencia consenso: RXXxRXXXRh; los péptidos 14, 15 y 16 tienen la secuencia consenso: RXXRXXXRh; los péptidos 23, 24 y 25 tienen la secuencia consenso: rXXXrXXXr. La conjugación entre los péptidos y FITC se efectuó a través de un enlace peptídico covalente normal al a.a. N-terminal de los péptidos. +/- indica la presencia o ausencia de extractos celulares.

**Figura 11** Crecimiento de células procedentes de macrófagos en bruto incubadas con 2,5  $\mu\text{M}$  del análogo de nucleósido indicado o el análogo en forma de un conjugado con el péptido RYF (SEQ ID NO: 2) en presencia de rojo de fenol. Los cultivos que contienen células en división viran a medio transparente, mientras que el medio de los cultivos que contienen células no en división permanecen oscuros (compuestos activos) (Figura 11A). También se determinó el porcentaje de crecimiento midiendo el contenido relativo de LDH (Figura 11B).

**Figura 12** Crecimiento de células procedentes de macrófagos en bruto expuestas a 3' amino  $\beta$ -D-arabinofuranósido ya sea solas o en forma de un conjugado con el péptido RYF (SEQ ID NO: 2) en presencia de rojo de fenol. Los cultivos que contienen células en división viran a medio transparente, mientras que el medio de los cultivos que contienen células no en división permanecen oscuros. Solo la conjugación a RYF (SEQ ID NO: 2) a través de un enlace de D-aminoácido demostró citotoxicidad.

- 5 **Figura 13** Crecimiento de células procedentes de macrófagos en bruto expuestas a 3'AdT (3' amino desoxitimidina) y 3' amino  $\beta$ -D-arabinofuranósido (Ribo) ya sea solas o en forma de un conjugado con el péptido RYF (SEQ ID NO: 2) en presencia de rojo de fenol. Los cultivos que contienen células en división viran a medio transparente, mientras que el medio de los cultivos que contienen células no en división permanecen oscuros. El enlace con el D-enantiómero "e" convierte a los compuestos inactivos en otros altamente citostáticos.
- 10 **Figura 14** Crecimiento de células MOLT4 expuestas al compuesto indicado o al compuesto en forma de un conjugado con el péptido RYF (SEQ ID NO: 2) (un péptido ejemplificado de la invención).
- Figura 15** Esquema que detalla las distancias medias entre restos químicos potencialmente interactuantes de TAT y C4S. Los números en recuadro identifican la numeración de restos para cada molécula usada en las simulaciones y como se describe en el presente documento.
- 15 **Figura 16** Esquema que detalla las distancias medias entre restos químicos potencialmente interactuantes de TAT y C4S. Los números en recuadro identifican la numeración de restos para cada molécula usada en las simulaciones y como se describe en el presente documento.
- 20 **Figura 17** Frecuencia de la aparición de interacciones entre pares de restos de TAT y C4S, calculadas a lo largo de 30 simulaciones de MD, cada una de 20 ns de longitud, comenzando a partir de (A) el triplete de pares de restos que interactúan 1/4; 3/5; y 5/6 de TAT y C4S, respectivamente; y (B) el triplete de pares de restos que interactúan 3/4; 5/5 y 7/6 de TAT y C4S, respectivamente. Los intervalos de las frecuencias de aparición calculados son 90-100 % (cuadrado), 80-90 % (cruz), 70-80 % (triángulo), 50-70 % (estrella) y 30-50 % (rombo). Los círculos con línea continua muestran los pares de restos que interactúan introducidos al inicio de la simulación de MD, mientras que los círculos con líneas discontinuas muestran los pares de restos que interactúan esperados que deberían formarse de manera espontánea en caso de que el esquema de interacción hipotético sea correcto.
- 25 **Figura 18** (A) Conformación inicial del complejo TAT/C4S usado para iniciar la simulación de MD (cuyos resultados están presentes en la Figura 17 A). Solamente interactúan los restos 1/4, 3/5 y 5/6 de TAT y C4S, respectivamente. (B) Un fragmento extraído de una de las simulaciones de MD que muestra la formación espontánea de interacciones entre los restos 7 y 9 de TAT y los restos altamente numerados de C4S, incluyendo los restos 7 y 8.
- 30

## 35 6. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a moléculas, péptidos, polipéptidos y compuestos que comprenden o consisten en dichas moléculas, péptidos o polipéptidos que tienen secuencias o estructuras consenso específicas y su uso para el transporte específico de grupos biológicamente activos (BAM) al ambiente intercelular, es decir, el citoplasma y/o el núcleo. Los inventores han descubierto sorprendentemente que ciertas estructuras o secuencias consenso de las moléculas y péptidos son capaces de dirigirse de manera selectiva a proteoglicanos específicos, en particular a condroitín-4-sulfato (C4S). Por consiguiente, las moléculas, proteínas, polipéptidos y compuestos que comprenden o consisten en dichas moléculas, péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una o más de las secuencias consenso divulgadas en el presente documento pueden ser particularmente útiles como grupos de transporte para el suministro dirigido de BAM a células que expresan C4S.

Aunque se conoce la unión de ciertos péptidos a proteoglicanos y fosfolípidos, se ha visto con anterioridad como un proceso no específico dirigido principalmente mediante interacciones hidrostáticas ubicuas. Como tal, no se ha sugerido con anterioridad que dichas interacciones puedan ser manipuladas para conferir selectividad, impidiendo que los péptidos fueran usados para una diana específica. A pesar de la naturaleza ubicua percibida de estas interacciones, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que pueden diseñarse secuencias de péptido específicas que muestren selectividad por ciertos proteoglicanos frente a fosfolípidos en general. Específicamente, los presentes inventores han descubierto que un péptido que comprende una secuencia de 9 restos que tiene argininas en las posiciones 1, 5 y 9 y una lisina o arginina en la posición 3 o 7 o un constructo molecular que muestra una conformación en 3D relativa equivalente a la de estos 4 restos (por ejemplo, un constructo resto-espaciador), interactúa de manera óptima mediante puente electrostático con los sulfatos de las unidades de aminoglucano de C4S. Además, la inclusión de aminoácidos no cargados o espaciadores químicos no cargados positivamente en las posiciones restantes proporciona selectividad, inhibiendo o reduciendo sustancialmente la interacción no específica del péptido con otros proteoglicanos y/o fosfolípidos. Por lo tanto, la combinación única de restos y/o la presentación en 3D de restos específicos permite diseñar péptidos y constructos de resto-espaciador que muestran unión selectiva a los proteoglicanos C4S, frente a otros proteoglicanos y otros fosfolípidos.

Se sabe que C4S está solamente parcialmente sulfatado, es decir, la molécula no está sulfatada en todos los sitios de sulfatación potenciales. Las simulaciones computarizadas de interacciones moleculares revelaron que las argininas en, al menos las posiciones 1, 5 y 9 de un péptido de 9 componentes (y/o en las posiciones en 3D equivalentes de un péptido de 9 componentes, por ejemplo, en un constructo resto-espaciador) interactuaron de manera específica con

el patrón de sulfato específico a C4S. También se observó que, para una unión específica, era necesario un aminoácido cargado adicional, en particular, una arginina o una lisina, en la posición 3 o 7 (y/o en su posición en 3D correspondiente), pero no ambas. Las simulaciones de modelo sugieren que la posición 3 o la posición 7 son equivalentes en tres dimensiones en el 9-mero, en particular, dentro de la orientación espacial de los otros restos relevantes para la interacción, es decir, en las posiciones 1, 5 y 9.

Según el modelo, no se predijo que los demás restos estén implicados en la unión del péptido a C4S y, dado que la conformación lineal tridimensional de los restos 1, 5, 9 y (3 o 7) no se vio alterada en el péptido, la sustitución con una gran variedad de aminoácidos (incluyendo aminoácidos no naturales, tales como D-aminoácidos) en las posiciones libremente seleccionables 2, 4, 6, 8 y (3 (cuando 7 se selecciona como lisina o arginina) o 7 (cuando 3 se selecciona como lisina o arginina)) tuvo de poco a ningún efecto en la unión específica a C4S. Por consiguiente, los inventores descubrieron sorprendentemente que en tanto que se mantenga la presentación y/o la orientación en 3D de estos 3 restos de arginina y un resto de lisina o arginina en la molécula, se mantendrá la unión específica a C4S. Por lo tanto, la invención abarca el reemplazo de los restos en estas posiciones libremente seleccionables con espaciadores químicos a condición de que se mantenga la orientación relativa en 3D de las argininas en las posiciones 1, 5 y 9 y la arginina o lisina en la posición 3 o 7, tal como en las secuencias consenso (i) y (ii). Sin embargo, el uso de los aminoácidos cargados arginina o lisina en estas posiciones libremente seleccionables (donde están presentes restos aminoacídicos) y/o de grupos de enlace cargados, en particular, de grupos cargados positivamente, aumentó la probabilidad de interacciones no específicas con otros proteoglicanos y fosfolípidos. Por lo tanto, para mantener la especificidad, se evita el uso de arginina y lisina en las posiciones libremente seleccionables en los péptidos de la invención y/o se evita el uso de grupos de enlace cargados donde se reemplazan uno o más de los restos libremente seleccionables por un enlazador químico en los constructos resto-enlazador de la invención.

Adicionalmente, se descubrió que puede mantenerse la especificidad usando D-aminoácidos en las moléculas de la invención (por ejemplo, péptidos o constructos resto-espaciador) en las posiciones relevantes para la unión a C4S, es decir, Arg1, Arg5, Arg9 y (Arg/Lys3 o Arg/Lys7), a condición de que todas las posiciones tengan la misma quiralidad. Se cree que el uso de una sola quiralidad en estas posiciones presenta la misma estructura tridimensional de las cadenas laterales de aminoácido. En los casos donde una o más de estas posiciones tenga una quiralidad diferente, se distorsiona la disposición lineal tridimensional. Por lo tanto, la invención abarca una molécula que comprende 3 restos de arginina y un resto de arginina o lisina, en donde cada uno de los 4 restos es un resto L o en donde cada uno de los 4 restos es un resto D, a condición de que la molécula presente los restos en la misma orientación y configuración en 3D o una similar a la de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 en las secuencias consenso (i) y (ii) (en particular, cuando las moléculas se encuentran en solución).

Las secuencias consenso de las moléculas de la invención están concebidas preferentemente como grupos transportadores, útiles en el transporte intercelular de moléculas/grupos de carga asociadas. Se sabe que las moléculas de la superficie celular que contienen proteoglicanos, por ejemplo, CD68, son cicladas mediante endosomas. Para favorecer la liberación del compuesto de la invención del endosoma (y ayudar además a evitar la degradación), uno a varios restos aminoacídicos capaces de actuar como esponja de protones pueden ser añadidos al extremo N o C-terminal del grupo transportador. La esponja de protones aumenta la osmolaridad del endosoma, provocando hinchazón y ruptura, que da lugar a la liberación citosólica de sus contenidos en lugar de su degradación. Puede ser usada cualquier resto aminoacídico o combinación de restos conocida en la técnica o descrita en el presente documento capaz de funcionar como esponja de protones de acuerdo con la invención. El aminoácido final de esta serie opcional de restos de esponja de protones (es decir, el resto final N-terminal o C-terminal de los restos de esponja de protones (cuando están presentes)) también pueden ser opcionalmente un D-enantiómero para evitar la degradación/escisión de los restos de esponja de protones. Por consiguiente, la invención abarca el uso opcional de uno o más restos de aminoácido añadidos al extremo N o C-terminal del grupo transportador, en donde el resto N o C-terminal, respectivamente, es opcionalmente un enantiómero D. En realizaciones preferidas, los uno o más restos de los restos de la esponja de protones no son restos de lisina o arginina. Los restos opcionales de la esponja de protones tal como se define en el presente documento están representados en las secuencias consenso (i) a (xiv) de la invención por LD<sub>10</sub> o LD<sub>-1</sub>. El resto N o C-terminal opcional de la esponja de protones está representado en las secuencias consenso (i) a (xiv) de la invención por XD<sub>11</sub> o XD<sub>-2</sub>. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, LD<sub>10</sub> o LD<sub>-1</sub> de las secuencias consenso (i) a (xiv) (cuando están presentes) representan cualquier L o D-aminoácido distinto de L o D-arginina o L o D-lisina; en relación con estas realizaciones preferidas o como realizaciones independientes, XD<sub>11</sub> o XD<sub>-2</sub> de las secuencias consenso (i) a (xiv) (cuando están presentes) son preferentemente cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina. En las realizaciones más preferidas, los uno o más restos de la esponja de protones son restos de histidina. Por lo tanto, en las realizaciones más preferidas, LD<sub>10</sub> o LD<sub>-1</sub> de las secuencias consenso (i) a (xiv) representan L o D-histidina; en relación con estas realizaciones más preferidas o como realizaciones independientes, XD<sub>11</sub> o XD<sub>-2</sub> de las secuencias consenso (i) a (xiv) son más preferentemente D-histidina.

## 6.1 Estructuras consenso de moléculas

Los descubrimientos anteriores de los inventores pueden ser presentados como una estructura consenso. La invención se refiere de manera general a al menos una molécula aislada o a compuestos que comprenden o consisten en dicha molécula, en donde la molécula tiene una estructura consenso de acuerdo con uno cualquiera de (iii) a (vi) o las inversas de las mismas:



- (iii) Arg<sub>1</sub>(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;
- (iv) Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;
- (v) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>; o
- (vi) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>

en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1;

en donde

- (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o
- (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que

- (a) consiste en una cadena de péptido de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto puede seleccionarse independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o
- (b) separa los restos de aminoácido adyacentes por  $12,9 \pm 1,5$  Å;

en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que

- (a) consiste en un solo resto aminoacídico que puede ser cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o
- (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5$  Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida;

y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico

- (a) en donde SP<sub>B</sub> y SP<sub>C</sub> representan cada uno un solo resto aminoacídico que puede seleccionarse independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o
- (b) que separa los restos aminoacídicos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5$  Å cuando el constructo se encuentra en conformación extendida.

Cuando la molécula o el compuesto de la invención comprende uno o más espaciadores/enlazadores químicos que no están formados exclusivamente por restos aminoacídicos, se ha de tener cuidado de que las cadenas laterales de Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 retengan la misma presentación en 3D o una similar a sus cadenas laterales equivalentes en las secuencias consenso de péptido y/o polipéptido (i) y/o (ii). Por lo tanto, las cadenas laterales de Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 dentro de los constructos resto-espaciador de acuerdo con los métodos de la invención deben presentarse en una disposición lineal o prácticamente lineal dentro del espacio 3D cuando la molécula y/o el constructo se encuentra en conformación extendida.

## 6.2 Secuencias consenso de péptido

En realizaciones de la invención en donde las moléculas y/o compuestos de acuerdo con cualquiera de las estructuras consenso (iii) a (vi) comprenden o consisten únicamente en restos aminoacídicos, las estructuras consenso pueden ser representadas por secuencias consenso de un péptido o polipéptido. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a compuestos que comprenden o consisten en al menos un péptido o polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la siguiente secuencia consenso (i) o (ii) o las inversas de las mismas:

- (i) Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>, o
- (ii) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>

en donde,

- (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; y en donde el resto de aminoácidos X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que uno de X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, represente L-lisina o L-arginina;

- o en donde,
- (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; y en donde el resto de aminoácidos X<sub>2</sub> a X<sub>4</sub> y X<sub>6</sub> a X<sub>8</sub> pueden ser cualquier L o D-aminoácido distinto de L-lisina, D-lisina, L-arginina o D-arginina, a condición de que uno de X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub>, pero no ambos, represente D-lisina o D-arginina.

La secuencia consenso (i), anterior, con las condiciones (a) es la SEQ ID NO: 17 y con las condiciones (b) es la SEQ ID NO: 19. La secuencia consenso (ii), anterior, con las condiciones (a) es la SEQ ID NO: 18 y con las condiciones (b) es la SEQ ID NO: 20.

### 5 6.3 Estructuras consenso de resto-espaciador

En las realizaciones de la invención en donde los enlazadores/espaciadores químicos representados por SP<sub>A</sub>, SP<sub>B</sub>, y SP<sub>C</sub> en cualquiera de las estructuras consenso (iii) a (vi) no comprenden restos aminoacídicos, las estructuras consenso pueden ser representadas por estructuras consenso de un constructo resto-espaciador. En dichas realizaciones, la invención puede definirse como dirigida a al menos un constructo resto-espaciador o a compuestos que comprenden o consisten en el mismo, en donde el constructo tiene una estructura consenso de acuerdo con uno cualquiera de (vii) a (x) o las inversas de las mismas:

- 15 (vii) Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>B</sub>)-X-(CL<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (viii) Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>C</sub>)-X-(CL<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (ix) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>B</sub>)-X-(CL<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>; o  
 (x) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>C</sub>)-X-(CL<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>

20 en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1;  
 en donde

- 25 (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o  
 (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoacídicos adyacentes por 12,9 ± 1,5 Å; en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoacídicos adyacentes por 7,5 ± 1,5 Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida;

30 y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoacídicos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por 12,9 ± 1,5 Å cuando el constructo se encuentra en conformación extendida.

35 Cuando la molécula o el compuesto de la invención comprende uno o más espaciadores/enlazadores químicos que no están formados exclusivamente por restos aminoacídicos, se ha de tener cuidado de que las cadenas laterales de Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 retengan la misma presentación en 3D o una similar a sus cadenas laterales equivalentes en las secuencias consenso de péptido y/o polipéptido (i) y/o (ii). Por lo tanto, las cadenas laterales de Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 dentro de los constructos resto-espaciador de acuerdo con los métodos de la invención deben presentarse en una disposición lineal o prácticamente lineal dentro del espacio 3D cuando la molécula y/o el constructo se encuentra en conformación extendida.

### 6.4 Grupos de direccionamiento

45 Las moléculas y compuestos descritos anteriormente de acuerdo con las secuencias consenso (iii) a (vi) son particularmente útiles como grupos de transporte y/o direccionamiento, reconociendo y/o uniéndose específicamente a proteoglicanos, por ejemplo, expresados sobre la superficie de una célula, en particular, uniéndose de manera selectiva al proteoglicano C4S frente a otros proteoglicanos. La porción de las secuencias consenso anteriores (iii) a (vi) que actúan como el grupo de direccionamiento que interactúa de manera específica con el proteoglicano C4S está representada por Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub> o Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub> (incluyendo las realizaciones específicas que tienen las secuencias o estructuras consenso de grupo de direccionamiento Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 21, en los casos donde es un fragmento de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22, en los casos donde es un fragmento de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20), Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>B</sub>)-X-(CL<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub> y Arg<sub>1</sub>-(CL<sub>C</sub>)-X-(CL<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(CL<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>) son moléculas idénticas respecto de la presentación en 3D de los restos aminoacídicos correspondientes a Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, Arg<sub>9</sub> y Arg/Lys3 o Arg/Lys 7 y, en particular, de las cadenas laterales de estos restos. Por consiguiente, se puede desarrollar como grupo de direccionamiento cualquier molécula que comprenda 3 restos de arginina y un resto de lisina de acuerdo con las secuencias consenso (iii) a (vi) de acuerdo con las siguientes reglas:

- 60 (1) Cada uno de los restos Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> han de ser el mismo isómero óptico de arginina, es decir, cada uno ha de ser una L-arginina o cada uno ha de ser una D-arginina.  
 (2) Arg<sub>1</sub> ha de estar unida a Arg<sub>5</sub> usando uno o más espaciadores químicos (que pueden consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos y espaciadores/enlazadores químicos) de tal forma que están separadas por 12,9 ± 1,5 Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida; Arg<sub>5</sub> ha de estar unida además a Arg<sub>9</sub> usando uno o más espaciadores químicos (que pueden consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos y espaciadores/enlazadores químicos) de tal forma que también están separadas por 12,9 ± 1,5 Å cuando la molécula se encuentra en conformación extendida.

(3) El grupo de direccionamiento también ha de comprender un resto de arginina o lisina en el enlace entre Arg1 y Arg5 o entre Arg5 y Arg9 (pero no ambos) que tenga la misma quiralidad que la Arg1, Arg5 y Arg9 (este resto corresponde al resto en la posición 3 o 7 (pero no ambos simultáneamente) en las secuencias consenso (i) y (ii) y que el resto "X" en las secuencias consenso (iii) a (x)). En otras palabras, en los casos en los que Arg1, Arg5 y Arg9 son L-arginina, la lisina/arginina ha de ser una L-lisina o una L-arginina; y en los casos donde Arg1, Arg5 y Arg9 son D-arginina, la lisina/arginina ha de ser una D-arginina o una D-lisina.

(4) En los casos donde la lisina/arginina está posicionada en el enlace entre Arg1 y Arg5, está separada de Arg1 por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ; en los casos donde la lisina/arginina está posicionada en el enlace entre Arg5 y Arg9, está separada de Arg9 por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$ .

(5) Los enlaces restantes pueden comprender cualquier espaciador o enlazador químico conocido en la técnica y/o descrita en el presente documento (que puede consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos o puede comprender tanto restos aminoacídicos como espaciadores/enlazadores químicos) adecuados para mantener la separación necesaria de Arg1, Arg5, Arg9 y X, así como adecuados para mantener una orientación en 3D y/o una presentación en 3D de los aminoácidos y sus cadenas laterales similares o iguales a aquella de los restos correspondientes en las secuencias consenso (i) y (ii). Los enlaces entre Arg1, Arg5, Arg9 y X no deben estar cargados positivamente. En los casos en los que los enlaces entre Arg1, Arg5, Arg9 y X son restos aminoacídicos o comprenden restos aminoacídicos, dichos restos pueden ser cualquier D o L-aminoácido distinto de D o L-arginina o D o L-lisina.

En los casos donde las estructuras consenso de la invención consisten o comprenden exclusivamente aminoácidos, el grupo de direccionamiento tal como se ha descrito anteriormente puede diseñarse del siguiente modo. La secuencia del grupo de direccionamiento en las estructuras consenso (iii) a (vi), donde la estructura consiste en o comprende exclusivamente restos aminoacídicos, se representa por Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub> (véanse, por ejemplo, las secuencias consenso (i) y (ii)). La estructura cumple la regla (2) anterior. Es decir, el enlace que separa a Arg1 y Arg5 y que separa a Arg5 y Arg9 en  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$  cuando la molécula se encuentra en la conformación extendida es un péptido que consiste en 3 restos aminoacídicos. Las reglas descritas inmediatamente antes tal como se aplican además a la secuencia consenso del péptido son:

(P1) Cada uno de los restos Arg1, Arg5 y Arg9 han de ser el mismo isómero óptico de arginina, es decir, cada uno ha de ser una L-arginina o cada uno ha de ser una D-arginina (correspondiente a la regla (1) anterior).

(P2) El resto X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub> (pero no ambos) es una lisina o arginina con la misma quiralidad que Arg1, Arg5 y Arg9. Es decir, en los casos en los que Arg1, Arg5 y Arg9 son L-arginina, X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub> (pero no ambos) han de ser una L-lisina o una L-arginina; y en los casos donde Arg1, Arg5 y Arg9 son D-arginina, X<sub>3</sub> o X<sub>7</sub> (pero no ambos) han de ser una D-arginina o una D-lisina (correspondiente a la regla 3 y 4 anterior).

(P3) Los demás restos, es decir, X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>8</sub> y X<sub>3</sub> (donde X<sub>7</sub> se selecciona de acuerdo con la regla P2 inmediatamente anterior) o X<sub>7</sub> (donde X<sub>3</sub> se selecciona de acuerdo con la regla P2 inmediatamente anterior) puede ser un aminoácido distinto de L o D-arginina o L o D-lisina.

## 6.5 Enlazadores químicos

SP<sub>A</sub>, SP<sub>B</sub>, y SP<sub>C</sub> en las secuencias consenso (iii) a (xiv) representan enlazadores/espaciadores químicos que forman parte de la cadena principal de la molécula de la invención y pueden comprender o consistir exclusivamente en uno o más restos aminoacídicos; pueden comprender o consistir en uno o más enlazadores químicos (es decir, que no son restos aminoacídicos); o pueden comprender tanto restos aminoacídicos como enlazadores químicos. Los enlazadores químicos que no son restos aminoacídicos que son útiles de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser cualquier enlazador químico o espaciador químico adecuado para mantener el espaciado y la orientación/presentación en 3D relativa de los 3 restos de arginina (es decir, Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub>) y la arginina o lisina (es decir, Arg/Lys<sub>3</sub> o Arg/Lys<sub>7</sub> pero no ambos) equivalente a los restos correspondientes en las secuencias consenso (i) y (ii). Cualquiera de dichos enlazadores/espaciadores químicos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento pueden ser usados en la construcción de las moléculas de la invención y se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia seleccionar y adaptar dichos enlazadores a los métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de enlazadores/espaciadores químicos adecuados incluyen péptidos beta y gamma, tales como aquellos divulgados y descritos, por ejemplo, en Seebach et al., Chem. Biodivers. 1(2004), 1111-1239; cadenas principales a base de aminoácidos de azúcar, tales como los divulgados y descritos en, por ejemplo, Chakraborty et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 5(2002), 373-387; peptidomiméticos en horquilla beta, tales como los divulgados y descritos en, por ejemplo, Robinson, Acc. Chem. Res. 41(2008), 1278-1288; miméticos de hélice alfa, miméticos de lámina beta/hebra beta y miméticos de giro beta, tales como los divulgados y descritos en, por ejemplo, Hershberger et al., Curr. Top. Med. Chem. 7(2007), 928-924 y ciclótidos como los divulgados y descritos en, por ejemplo, Jagdish y Camarero, Biopolymers 94(2010), 611-616. En realizaciones preferidas, los enlazadores/espaciadores químicos no están cargados positivamente.

## 6.6 Conjugados de BAM

Tal como se detalla en el presente documento, las moléculas y compuestos de la invención que comprenden o consisten en las moléculas, péptidos y/o polipéptidos de acuerdo con las secuencias y estructuras consenso (i) a (x) son concebidas en realizaciones preferidas para que funcionen como grupos transportadores capaces de transportar

de manera específica moléculas/grupos de carga asociados. En realizaciones preferidas, las moléculas y compuestos de la invención comprenden o consisten en las secuencias y/o estructuras de acuerdo con cualquiera de las secuencias consenso (i) a (x) conjugadas adicionalmente a un grupo biológicamente activo (BAM); la estructura es referida como un conjugado de BAM a lo largo de la presente descripción. El BAM es cualquier grupo que se sepa o que se espere que muestre un efecto terapéutico cuando se administra a un organismo o cuando se introduce en una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones preferidas, los compuestos de la invención comprenden o consisten en un conjugado de BAM, teniendo un BAM conjugado en el extremo de una secuencia o estructura consenso (i) a (x) tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en estas realizaciones preferidas, el conjugado de BAM tiene una estructura consenso de acuerdo con las siguientes estructuras consenso (xi) a (xiv) o las inversas de las mismas:

- (xi) (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (xii) (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (xiii) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM); o  
 (xiv) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM)

en donde (BAM) representa un grupo biológicamente activo; en donde (ENLACE) representa un grupo enlazador opcional; en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10; en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; en donde

- (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o  
 (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que

- (a) consiste en una cadena de péptido de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) separa los restos de aminoácido adyacentes por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ;

en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que

- (a) consiste en un solo resto aminoacídico que puede ser cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$  cuando la molécula se encuentra en conformación extendida;

y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico

- (a) en donde SP<sub>B</sub> y SP<sub>C</sub> representan cada uno un solo resto aminoacídico que puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) que separa los restos aminoacídicos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$  cuando el constructo se encuentra en conformación extendida.

### 6.6.1 El grupo enlazador opcional

Las secuencias consenso (xi) a (xiv) son idénticas a las secuencias consenso (iii) a (vi), respectivamente, salvo por la presencia del grupo BAM y del grupo enlazador opcional, (ENLACE). Por lo tanto, la selección de los espaciadores químicos (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>), que pueden consistir o comprender exclusivamente de restos aminoacídicos o comprender tanto enlazadores químicos como restos aminoacídicos, tal como se describe en el presente documento) se produce como se describe en el presente documento respecto de las secuencias consenso (iii) a (vi), incluyendo

- selección de estos espaciadores químicos que consisten de o comprenden exclusivamente de restos aminoacídicos de acuerdo con las realizaciones (y combinaciones de las mismas) de las secuencias consenso (i) y (ii) tal como se detallan a lo largo de la presente divulgación y
- selección de estos espaciadores químicos que comprenden tanto enlazadores químicos como restos aminoacídicos de acuerdo con las realizaciones (y combinaciones de las mismas) de las estructuras consenso (vi) a (x) tal como se detalla a lo largo de la presente divulgación.

El grupo enlazador opcional (ENLACE) puede ser un enlazador peptídico. En caso de usarse secuencias de enlazador peptídico, las secuencias enlazadoras forman preferentemente una secuencia flexible de 2 a 10 restos, más preferentemente de 1 a 5 restos. En una realización preferida, la secuencia enlazadora contiene al menos un 20 %, más preferentemente, al menos un 40 % y aún más preferentemente al menos un 50 % de restos de Gly o β-alanina. Ejemplos no limitantes de grupos enlazadores incluyen, GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 23), GlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 24), GlyGlyGly, CysGlyGly o GlyGlyCys, etc. Secuencias enlazadoras adecuadas son bien conocidas en la técnica

y pueden ser seleccionadas y preparadas fácilmente por una persona experta en la materia. El grupo enlazador opcional puede estar compuesto por D-aminoácidos, L-aminoácidos y/o combinaciones de los mismos.

Como alternativa, el BAM y el grupo transportador pueden estar unidos mediante acoplamiento químico de cualquier modo adecuado conocido en la técnica o descrito en el presente documento, tales como métodos de reticulación. Sin embargo, se ha de señalar el hecho de que muchos métodos de reticulación química conocidos son inespecíficos, es decir, no dirigen el punto de acoplamiento a cualquier sitio particular en el grupo portador/transportador o en el grupo de carga (por ejemplo, BAM). Por lo tanto, el uso de agentes de reticulación no específicos puede atacar a los sitios funcionales o bloquear estéricamente los sitios activos, haciendo que uno o ambos de los componentes de BAM/transportador de la molécula de conjugado de BAM de la invención sean biológicamente inactivos. Se emplaza al experto en la materia a bloquear los grupos potencialmente reactivos mediante el uso de grupos protectores adecuados. Como alternativa, puede emplearse el uso de las potentes y versátiles técnicas de ligamiento de oxima e hidrazona, que son entidades quimiosselectivas que pueden ser utilizadas para la reticulación del componente (A) al componente (B). Esta tecnología de enlace se describe, por ejemplo, por Rose et al. (1994), JACS 116, 30.

La eficacia de acoplamiento también puede ser aumentada mediante acoplamiento químico directo a un grupo funcional encontrado solo una vez o unas pocas veces en el componente de BAM y el grupo transportador. Puede lograrse el acoplamiento de los dos componentes de la molécula de péptido-conjugado de la invención mediante un agente de acoplamiento o conjugación, como se conoce en la técnica, incluyendo reactivos de acoplamiento de síntesis de (poli)péptidos convencionales, tales como HOBt, HBTU, DICl, TBTU. Hay varios reactivos de reticulación intermoleculares que pueden ser utilizados, véase, por ejemplo, Means y Feeney, *Chemical Modification of Proteins*. Holden-Day, 1974, págs. 39-43. Estos reactivos incluyen, pero no se limitan a, 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida; N,N'-etilén-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo similar que tenga de 6 a 11 puentes de metileno de carbono; y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno. Otros reactivos reticulantes útiles para este fin incluyen, pero no se limitan a: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrofenilsulfona; adipimidato de dimetilo; fenol-1,4-disulfonilcloruro; diisocianato o diisotiocianato o azofenil-p-diisocianato de hexametileno; glutaraldehído y disdiazobencidina. Los reactivos de reticulación también pueden ser homobifuncionales, es decir, tienen dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferido es el bismaleimidohexano (BMH). El BMH contiene dos grupos funcionales de maleimida, que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo en condiciones suaves (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están conectados mediante una cadena hidrocarbonada. Por lo tanto, BMH es útil para la reticulación irreversible de proteínas (o polipéptidos) que contienen restos de cisteína. Los reactivos de reticulación también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo, un grupo reactivo amina y un grupo reactivo tiol, que reticularán dos proteínas que tengan aminas y tioles libres, respectivamente. Los ejemplos no limitantes de agentes reticulantes heterobifuncionales son succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), un análogo de cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estos agentes reticulantes reacciona con una amina primaria y la maleimida, reactiva con tiol, forma un enlace covalente con el tiol de un resto de cisteína. Debido a que los reactivos reticulantes normalmente tienen una baja solubilidad en agua, un resto hidrófilo, tal como un grupo sulfonato, pueden ser añadido al reactivo de reticulación para mejorar su solubilidad en agua. Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos reticulantes modificados para ser solubles en agua. Muchos reactivos reticulantes forman un conjugado que esencialmente no es escindible en condiciones celulares, aspecto no preferido. Por lo tanto, algunos reactivos reticulantes contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es escindible en condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son reticulantes escindibles bien conocidos. El uso de un reactivo reticulante escindible permite que el resto de carga, por ejemplo, BAM, se separe del nuevo grupo transportador tras su suministro dentro de la célula diana. Para este fin, también puede ser útil un enlace disulfuro directo. La reticulación química también puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre los grupos conjugados y de este modo, pueden ayudar a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede estar en forma de resto de proteína (o polipéptido) que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo, prolina. Como alternativa, un brazo espaciador puede formar parte del reactivo reticulante, tal como en "SPDP de cadena larga" (por ejemplo, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., n.º de cat. 21651 H). Se encuentran disponibles comercialmente numerosos reactivos reticulantes, incluyendo los analizados anteriormente. Se encuentran fácilmente disponibles instrucciones detalladas de los proveedores comerciales para su uso. Una referencia general acerca de la reticulación de proteínas y de la preparación de conjugados es: Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991).

Se apreciará que los diferentes componentes de la molécula de conjugado de BAM deben estar acoplados de tal modo que los diferentes componentes puedan seguir transmitiendo al menos parte de su actividad y/o propiedades individuales a la molécula de conjugado transportador-carga completa. Por ejemplo, el acoplamiento de los componentes no debe provocar, preferentemente, una pérdida total en el direccionamiento a C4S.

### 6.6.2 El grupo BAM

La invención abarca cualquier BAM conocido o que se espere que sea un componente terapéuticamente activo para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o afección o la mejora de un síntoma de la misma, por

ejemplo, tales como compuestos químicos, proteínas, liposomas, nanopartículas y (poli) péptidos. Además, o como alternativa, el BAM puede ser un marcador detectable útil en el diagnóstico de una enfermedad o afección, tal como un colorante fluorescente, un marcador radiactivo o un grupo quimioluminiscente.

#### 5 A. Fármacos citotóxicos

Preferentemente, el BAM del "conjugado de BAM" de la invención es un producto farmacéutico, por ejemplo, seleccionado entre fármacos citotóxicos o antitumorales que son adecuados como fármaco de quimioterapia. En general, los fármacos de quimioterapia para el componente (B) pueden dividirse en tres categorías principales basándose en su mecanismo de acción. Pueden

(a) detener la síntesis de los bloques de construcción de la molécula de preADN. Estos agentes funcionan de varias maneras diferentes. Los bloques de construcción del ADN son ácido fólico, bases heterocíclicas y nucleótidos, que se producen de manera natural dentro de las células. Todos estos agentes funcionan bloqueando alguna etapa en la formación de nucleótidos o desoxirribonucleótidos (necesarios para producir ADN). Cuando se bloquean estas etapas, los nucleótidos, que son los bloques de construcción del ADN y el ARN, no pueden sintetizarse. Por lo tanto, las células no pueden replicarse ya que no pueden producir ADN sin los nucleótidos. Los ejemplos de fármacos de esta clase incluyen metotrexato (Abitrexate®), fluorouracilo (Acrucil®), hidroxiurea (Hydrea®) y mercaptopurina (Purinethol®), tioguanina, tocoferol o, de manera más general, cualquier análogo de nucleótido, por ejemplo, análogos de 2'-desoxicidina;

(b) dañar directamente el ADN en el núcleo de la célula. Estos agentes dañan químicamente el ADN y el ARN. Impiden la replicación del ADN y o bien detienen completamente la replicación o provocan la producción de ADN o ARN antisentido (es decir, el nuevo ADN o ARN no codifica nada útil). Ejemplos de fármacos de esta clase incluyen cisplatino (Platinol®) y antibióticos - daunorrubicina (Cerubidina®), doxorubicina (Adriamycin®) perteneciente a la clase de agentes antitumorales de antraciclina y etopósido (VePesid®) o cualquier intercalante; además se incluyen radionúclidos (por ejemplo, alfa-radionúclidos) usados comúnmente para abordar el tratamiento del cáncer (por ejemplo, bismuto-213); o

(c) efectúan la síntesis o degradación de los husos mitóticos. Los husos mitóticos sirven como carriles moleculares con "polos norte y sur" en la célula cuando una célula comienza a dividirse en dos células nuevas. Estos husos son muy importantes debido a que ayudan a dividir el ADN recién copiado, de tal forma que va una copia a cada una de las dos células nuevas durante la división celular. Estos fármacos detienen la formación de estos husos y por lo tanto, detienen la división celular. Los ejemplos de fármacos de esta clase de interruptores de la mitosis incluyen: vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y paclitaxel (Taxol®).

El BAM del "conjugado de BAM" de la invención puede actuar de acuerdo con uno de los modos de acción anteriores. En otros términos, cada una de las clases de fármacos antitumorales, es decir, agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos antitumorales y hormonas esteroideas puede ser usada como componente BAM de la molécula conjugado carga-transportador de la invención. Para describir con más detalle estas clases de fármacos, se hace énfasis en que cada fármaco anticáncer también puede categorizarse de acuerdo con su efecto en el ciclo celular y la química celular, tal como se ha divulgado anteriormente. Los agentes alquilantes eliminan a las células atacando directamente al ADN.

Pueden usarse agentes alquilantes, en particular, en el tratamiento de leucemias crónicas, enfermedad de Hodgkin, linfomas y ciertos carcinomas de pulmón, mama, próstata y ovario. La ciclofosfamida es un ejemplo de un agente comúnmente usado. Las nitrosoureas actúan de un modo similar a los agentes alquilantes y también inhiben cambios necesarios para la reparación del ADN. Estos agentes atraviesan la barrera hematoencefálica y por lo tanto, se usan para tratar tumores cerebrales, linfomas, mieloma múltiple y melanoma maligno. Carmustina y lomustina son los principales fármacos de esta categoría. Los antimetabolitos son fármacos que bloquean el crecimiento celular interfiriendo con ciertas actividades, normalmente la síntesis de ADN. Una vez que son ingeridos dentro de las células detienen el desarrollo normal y la reproducción. Todos los fármacos en esta categoría afectan a la célula durante la fase "S" del ciclo celular. Pueden usarse antimetabolitos en el tratamiento de leucemias agudas y crónicas, coriocarcinoma y algunos tumores del tracto gastrointestinal, mama y ovario. Ejemplos no limitantes de antimetabolitos comúnmente usados son 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo (5FU). Los antibióticos antitumorales son un grupo de compuestos diverso. En general, actúan uniéndose al ADN e impidiendo la síntesis de ARN. Estos agentes se usan ampliamente en el tratamiento de una variedad de cánceres. Los fármacos más comúnmente usados en este grupo son doxorubicina (Adriamicina), mitomicina-C y bleomicina. Los alcaloides vegetales (vinca) son agentes antitumorales procedentes de plantas. Estos fármacos actúan de manera específica bloqueando la división celular durante la mitosis. Comúnmente, se usan en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, neuroblastomas, tumor de Wilms y cánceres de pulmón, mama y testículo. La vincristina y la vinblastina son agentes comúnmente usados en este grupo. Las hormonas esteroideas son útiles en el tratamiento de algunos tipos de tumores. Esta clase incluye adrenocorticosteroides, estrógenos, antiestrógenos, progesteronas y andrógenos. Aunque no está claro su mecanismo de acción específico, las hormonas esteroideas modifican el crecimiento de ciertos cánceres dependientes de hormonas. El tamoxifeno es un ejemplo, que se usa para el cáncer de mama dependiente de estrógenos. Todas las especies tumorales anteriormente mencionadas pueden tratarse mediante las moléculas de conjugado de BAM de la invención que comprenden como BAM cualquiera de los agentes antitumorales anteriores.

Un grupo de fármacos citotóxicos o antitumorales, que puede usarse como componente BAM del "conjugado de BAM" de la invención se selecciona entre fármacos alquilantes, antimetabolitos, citostáticos o fármacos relacionados con el tratamiento hormonal. En este contexto, se prefiere seleccionar como fármacos citotóxicos o antitumorales compuestos de metal, en particular, platino (derivado) y clases de taxol. En particular, el resto de fármaco se selecciona entre el grupo de fármacos que consiste en, por ejemplo, cisplatino, transplatino, satraplatino, oxaliplatino, carboplatino, nedaplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, azatioprina, fluorouracilo, (6)-mercaptapurina, metotrexato, nandrolona, aminoglutemida, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, procarbazona, docetaxel, paclitaxel, irinotecán, epipodofilotoxinas, podofilotoxina, vincristina, vinblastina, docetaxel, daunomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitoxantrona, topotecán, bleomicina, gemcitabina, fludarabina, navelbina y 5-FUDR. Se prefiere particularmente la clase de fármacos anticáncer que contienen metal, por ejemplo, la clase de compuestos de platino.

Fármacos citotóxicos o antitumorales adicionales, que puede usarse como componente BAM del "conjugado de BAM" de la invención son alitretinoína, altretamina, azatioprina, bicalutamida, busulfán, bortezomib, capecitabina, carfilzomib, ciclofosfamida, exemestano, letrozol, finasterida, fostamatinib, gefitinib, imatinib, lenalidomida, marizomib, acetato de megestrol, nilotinib, triptorelina, temozolomida, mifepristona, tretinoína, tamoxifeno, tenipósido, sulfato de peplomicina o la clase de las camptotecinas.

Fármacos citotóxicos o antitumorales adicionales que pueden usarse como componente BAM del "conjugado de BAM" de la invención son radionúclidos (por ejemplo, radionúclidos emisores de partículas alfa), tales como aquellos usados comúnmente en terapias diana para el cáncer bien conocidas en la técnica. Ejemplos no limitantes de dichos radionúclidos que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen molibdeno-99, tecnecio-99m, bismuto-213, cromo-51, cobalto-60, cobre-64, disprosio-165, erbio-169, holmio-166, yodo-125, yodo-131, iridio-192, hierro-59, lutecio-177, paladio-103, fósforo-32, potasio-42, renio-186, renio-188, samario-153, selenio-75, sodio-24, estroncio-89, xenón-133, iterbio-169, iterbio-177, itrio-90, radioisótopos de cesio, oro y rutenio. También se incluyen radioisótopos ciclotrón, tales como carbono-11, nitrógeno-13, oxígeno-15, flúor-18, cobalto-57, galio-67, indio-111, yodo-123, kriptón-81m, rubidio-82, estroncio-92, talio-201. Como alternativa o adicionalmente, cualquiera de los ejemplos no limitantes anteriores pueden ser también implementados para usos diagnósticos o de obtención de imágenes.

Otro grupo de fármacos citotóxicos o antitumorales, que puede usarse como componente BAM del "conjugado de BAM" de la invención son compuestos de indolocarbazol, por ejemplo, estaurosporina (y sus análogos) y rebecamicina. Cabe destacar que los compuestos que pertenecen a la clase de las anilinoquinazolininas (por ejemplo, gefitinib) también son particularmente preferidos como componente BAM de los conjugados de BAM de la invención.

Un grupo adicional de fármacos citotóxicos o antitumorales, que puede usarse como componente BAM del "conjugado de BAM" de la invención puede estar seleccionado entre inhibidores de topoisomerasas, tales como irinotecán o las quinesinas mitóticas o DHFR.

Adicionalmente, fármacos citotóxicos o antitumorales, que pueden usarse como componente BAM del "conjugado de BAM" de la invención pueden seleccionarse entre factores que inhiben o estimulan la proliferación celular (PDGF), vías intracelulares, por ejemplo, la vía de señalización de RAS/RAF, tal como un miembro de la vía de señalización de RAF/MEK/ERK (por ejemplo, RAF-1) o la vía de proteína quinasa activada por mitógeno, la familia de CMGC quinasa (que contiene CDK (quinasa dependientes de ciclina), MAPK, GSK3, CLK), Ser/Thr quinasa que pertenecen a la familia de AGC quinasa que contienen las familias de quinasa PKA, PKG, PKC, las tirosina quinasa receptoras implicadas, por ejemplo, en la neovascularización y la progresión tumoral, incluyendo el receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)-2, VEGFR-3, receptor  $\beta$  de factor de crecimiento derivado de plaquetas, Flt-3, el sistema de endotelina (ET), que incluye ET-1, ET-2, ET-3 y el receptor de ET<sub>A</sub> (ET<sub>AR</sub>) y ET<sub>BR</sub> y c-KIT, que se usan como diana, por ejemplo, inhibiendo su función y miembros de la familia de IGF, tales como IGF-1, IGF-2, IGF-1 R, IGF2R, etc.

Otro grupo de fármacos citotóxicos o antitumorales, que puede usarse como componente BAM del "conjugado de BAM-transportador" de la invención puede seleccionarse entre inhibidores que tienen como diana la proliferación de células tumorales y la angiogénesis tumoral. Se prefieren particularmente en este contexto inhibidores de quinasa antitumorales de molécula pequeña dirigidos contra dianas en células malignas y/o células vasculares que tienen actividad antiangiogénica. Los inhibidores de quinasa, tales como aquellos dirigidos hacia EGFR, Her2/neu, BCR-ABL, c-KIT, PKC, Raf y PI3, son antiangiogénicos gracias al bloqueo de la secreción de factores angiogénicos por las células malignas afectadas. Los inhibidores de quinasa, tales como aquellos dirigidos hacia VEGFR2, VEGFR1, PDGFR, PKC, Raf y PI3, son antiangiogénicos mediante efectos en células vasculares. Ejemplos de inhibidores sintéticos de quinasa dependientes de ciclina (CDKI) son, por ejemplo, olomoucina, flavopiridol, butirolactona y sus derivados y por tanto, restringen la proliferación de células tumorales. Por otro lado, compuestos antitumorales adecuados como componente BAM de la molécula de conjugado de péptido/conjugado de BAM pueden seleccionarse entre activadores de programas de apoptosis en células cancerosas (por ejemplo, estaurosporina) o regulando negativamente las proteínas antiapoptóticas, por ejemplo, Bcl-2.

### 6.7 Las posiciones libremente seleccionables

Tal como se describe en el presente documento, cuando la estructura consenso de la molécula o el compuesto de la invención de acuerdo con las estructuras (iii) a (vi) consiste o comprende exclusivamente restos aminoacídicos, el grupo de direccionamiento que interactúa específicamente con C4S está representado por la secuencia

Arg<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-Arg<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>

(SEQ ID NO: 21, sujeta a las reglas de la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18;

SEQ ID NO: 22, sujeta a las reglas de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20)

Tal como se detalla en el presente documento, las posiciones 2, 4, 6, 8 y (3 (en los casos donde la posición 7 se define como D o L-arginina o lisina de acuerdo con las reglas expuestas en el presente documento) o 7 (en los casos donde la posición 7 se define como D o L-arginina o lisina de acuerdo con las reglas expuestas en el presente documento)) tienen poco efecto en la unión específica de los compuestos de la invención a un proteoglucano de C4S, por lo tanto, estas posiciones se citan en el presente documento como libremente seleccionables. Tal como se ha indicado en el presente documento, se evita el uso de los aminoácidos cargados arginina o lisina, ya que estos tienden a aumentar la probabilidad de interacciones no específicas con los proteoglucanos, en general.

Adicionalmente, se cree que los grupos de direccionamiento muestran especificidad por C4S debido a la disposición lineal óptima de las argininas en las posiciones 1, 5, 9 y una arginina o lisina en la posición 3 o 7, por lo tanto, los demás aminoácidos se seleccionan preferentemente para evitar la inducción de estructuras en 3 dimensiones, tales como, por ejemplo,  $\alpha$ -hélices. La propensión a la formación de hélices  $\alpha$  es conocida para cada uno de los aminoácidos peptídicos de origen natural, por ejemplo, Chakrabartv et al., Protein Sci. 3(1994), 843-852, la clasificación del mayor al menor potencial de hélice  $\alpha$  es la siguiente: Ala > Arg<sup>+</sup> > Leu > Lis<sup>+</sup> > Glu<sup>o</sup> > Met > Gln > Glu<sup>-</sup> > Ile > Tyr > His<sup>o</sup> > Ser > Cys > Asn > Asp<sup>-</sup> > Asp > Trp > Phe > Val > Thr > His<sup>+</sup> > Gly > Pro

Por lo tanto, se prefiere que no se usen más de 3 aminoácidos con una alta probabilidad de formar una hélice  $\alpha$  en las posiciones libremente seleccionables. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, no se usan más de 3 alaninas en las posiciones libremente seleccionables. En realizaciones adicionales o alternativas preferidas, no se usa prolina en la posición libremente seleccionable.

Además, se prefiere que las posiciones libremente seleccionables sean aminoácidos voluminosos y/o hidrófobos, ya que dichos aminoácidos pueden ayudar a la inserción en membrana y a la penetración celular (véase, por ejemplo, Rothbard, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications. Lanel Ü (Ed), CRC Press (2000)). Por lo tanto, en realizaciones en donde la molécula o el compuesto de la invención consiste o comprende una secuencia de acuerdo con las secuencias consenso (i) o (ii), las posiciones libremente seleccionables, 2, 4, 6, 8 y (3 (en los casos donde la posición 7 se define como D o L-arginina o lisina de acuerdo con las reglas expuestas en el presente documento) o 7 (en los casos donde la posición 7 se define como D o L-arginina o lisina de acuerdo con las reglas expuestas en el presente documento)) se seleccionan independientemente entre Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile y Leu.

Se sabe que los D-aminoácidos potencian la resistencia a proteasas y/u otros medios de degradación de proteínas. Por lo tanto, en realizaciones preferidas adicionales, la posición 4 o la posición 6 es un D-aminoácido.

Obsérvese también que la secuencia consenso de los compuestos de la invención contiene restos aminoacídicos opcionales que actúan como esponja de protones. En las secuencias consenso (i) a (xiv), (XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub> o (XD-2)<sub>m</sub> y (LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub> o (LD-1)<sub>n</sub>, en donde m es 0 o 1 y n es 0-10, representan los aminoácidos de esponja de protones opcionales. Los restos de la esponja de protones pueden seleccionarse entre cualquier resto o combinación de restos que se conozca en la técnica o se describa en el presente documento capaz de actuar como una esponja de protones. En realizaciones preferidas, XD<sub>11</sub> o XD-2 representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina (en caso de que esté presente el resto) y LD<sub>10</sub> o LD-1 representan cualquier L o D-aminoácido distinto de L o D-arginina o L o D-lisina (en caso de que estén presentes los restos). En las realizaciones más preferidas, XD<sub>11</sub> o XD-2 representan D-histidina (en caso de que esté presente el resto) y LD<sub>10</sub> o LD-1 representan L o D-histidina (en caso de que estén presentes los restos). Tal como se reconoce en la técnica, la acumulación de restos aminoacídicos específicos (por ejemplo, histidina) dentro de las vesículas ácidas, tales como un endosoma, produce el efecto de esponja de protones. Por ejemplo, el anillo de imidazol de la histidina es una base débil que tiene la capacidad de adquirir una carga catiónica cuando el pH del ambiente cae por debajo de 6, que puede promover además la fusión de la membrana y el escape del endosoma.

Se contempla expresamente que las realizaciones descritas en esta sección y a lo largo de la presente solicitud, ya se identifiquen como preferidas (incluyendo más preferidas) o no, pueden implementarse de manera independiente o pueden combinarse con otras realizaciones divulgadas en el diseño o la selección de un compuesto de la invención. Por lo tanto, la secuencia consenso y/o el grupo de direccionamiento del compuesto puede, opcionalmente, no cumplir ninguna o cumplir una o más de una de las realizaciones indicadas en esta sección y/o a lo largo de la descripción. Como ejemplo no limitante de dicha combinación, las posiciones libremente seleccionables pueden seleccionarse independientemente entre Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile y Leu, la posición 4 puede ser un D-aminoácido, n de (LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub> puede ser 0 y m de (XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub> puede ser 1.

La nueva configuración de D/L aminoácidos y/o la nueva combinación de enlazadores/espaciadores químicos y/o la



combinación de los compuestos de la invención permiten a una persona experta definir la persistencia *in vivo* o *in vitro*, de la molécula o del compuesto de la invención, tal como se ha definido anteriormente, en la célula, específicamente, con una semivida que se asemeja estrechamente a la semivida de, por ejemplo, el BAM que se va a administrar en la célula o el núcleo antes de la degradación del constructo transportador mediante proteasas.

5 En el contexto de la presente invención, las variantes y/o fragmentos de los péptidos y/o polipéptidos comprenden o consisten preferentemente en una secuencia de (poli)péptido que tiene al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % u 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente, al menos un 95 % y lo más preferentemente, al menos un 99 % de identidad de secuencia a lo largo de la longitud completa de la secuencia de los (poli)péptidos divulgados expresamente en el presente documento y sujeta a las reglas para la selección de las secuencias consenso.

### 6.8 Uso de los compuestos de la invención

15 Las secuencias consenso (i) a (x) de la invención están concebidas como grupos transportadores que efectúan el transporte a través de la membrana celular y al interior del citoplasma y/o núcleo de una célula. Es común para todos los compuestos terapéuticos (es decir, BAM) divulgados en el presente documento que tengan que atravesar la membrana celular para actuar como fármacos anticáncer. Mediante el acoplamiento de compuestos que pertenecen a estas clases (compuestos que dañan directamente el ADN en el núcleo de la célula, efectuando la síntesis o la degradación de los husos mitóticos o deteniendo la síntesis de los bloques de construcción de moléculas de pre-ADN) a las secuencias consenso (i) a (x) de la invención, se potencia la entrada de los compuestos anticáncer al interior de la célula y/o se mejora su solubilidad, aumentando de este modo la eficacia de estos compuestos terapéuticos. A su vez, el aumento de la captación celular y, preferentemente, la mejor solubilidad de estos compuestos en el ambiente acuoso (por ejemplo, el citosol) permite lograr reducir la dosis del compuesto terapéutico anticáncer.

25 Las secuencias consenso de los grupos de direccionamiento de los compuestos de la invención tiene como diana, en particular, el proteoglicano C4S. Estos proteoglicanos se expresan preferencialmente junto con las proteínas de superficie, por ejemplo, CD68, de los leucocitos. De hecho, es probable que los leucocitos no expresen otra forma de proteoglicano. Por consiguiente, las moléculas y compuestos de la invención permiten dirigirse específicamente a leucocitos. Por lo tanto, las moléculas, compuestos y métodos de la invención facilitan el suministro eficiente de grupos de carga, por ejemplo, BAM, a los leucocitos y proporciona un medio general para suministrar de manera selectiva una sustancia de interés dentro de un leucocito. Por lo tanto, se prefiere que el BAM que se va a conjugar al grupo transportador pueda ser cualquier sustancia que los expertos en la materia sepan o esperen que ejerza un efecto en la actividad de los leucocitos, incluyendo efectos terapéuticos (tales como tratamiento, prevención, atenuación o mejora de una enfermedad) o con el fin de marcar leucocitos, tal como para fines diagnósticos o para fines de investigación científica. Las células mieloides son una diana de particular interés.

40 Los conjugados de BAM de la invención pueden usarse para el tratamiento, mejora, profilaxis o diagnóstico de una gran variedad de enfermedades o afecciones en las que los leucocitos tienen una implicación fisiopatológica. afecciones ejemplificadas no limitantes que implican disfunción primaria o secundaria de leucocitos incluyen: neutrofilia, neutropenia, leucopenia, basopenia, basofilia, eosinopenia, eosinofilia, síndrome hipereosinófilo idiopático, leucocitosis linfocítica, linfocitosis, linfocitopenia, monocitosis, monocitopenia, anomalía de May Hegglin, anomalía de Pelger-Huet, anomalía de Alder-Reilly, síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Job (hiper-IgE), síndrome de los leucocitos perezosos, deficiencia de C3 congénita, enfermedad granulomatosa crónica, leucocitos, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiencia benigna de mieloperoxidasa, enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa, síndrome de DiGeorge, síndrome de Nezelof, agammaglobulinemia infantil ligada al sexo, hipogammaglobulinemia variable común, mucopolisacaridosis, lipodosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, gangliosidosis; Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Wolman, leucemia, leucemia linfocítica aguda (L1, L2, L3), leucemia linfocítica crónica, todas las formas de leucemia mielógena aguda (AML), incluyendo AML no diferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica, (M2), leucemia promielocítica, (M3), leucemia mielocítica (M4), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica, (M7), leucemia mielógena crónica, así como leucemias agudas no diferenciadas o bifenotípicas (leucemias que tienen características tanto linfocíticas como mieloides) y todas las formas de linfomas, incluyendo linfoma de Hodgkin, linfoma de linfocitos T, linfoma de linfocitos B, linfoma linfoplasmácico, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple y linfoma folicular.

60 Los conjugados de BAM de la invención son útiles, ya sea adicionalmente o como alternativa, en el tratamiento de enfermedades en donde la etiología es principalmente la disfunción de las células mieloides o linfoides. Ejemplos no limitantes de dichas enfermedades incluyen las diversas formas de la leucemia mielógena aguda (AML), en particular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia aguda no diferenciada, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, leucemia (aguda) de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielóide, leucemia de precursores de linfocitos B, leucemia de linfocitos T, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia de linfocitos T (en carcinoma de pulmón), leucemia cutánea de linfocitos T, leucemia monocítica humana, leucemia de mastocitos, leucemia de linaje mixto, tricoleucemia, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de células

grandes, leucemia de linfocitos T del adulto y todas las formas de linfomas, incluyendo linfoma de Hodgkin, linfoma de linfocitos T, linfoma de linfocitos B, linfoma linfoplasmácítico, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple y linfoma folicular.

- 5 Afecciones ejemplificadas que implican la disfunción de leucocitos secundarios incluyen infecciones por uno cualquiera de los siguientes patógenos: VIH, virus de Epstein Barr, Morbillivirus (sarampión), paramyxovirus, rubivirus, virus del herpes de tipo 6, virus del herpes, virus del dengue, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, parvovirus, virus sincitial respiratorio, virus variola, varicela, flavivirus, virus linfotrófico T humano de tipo 1, virus linfotrófico T humano de tipo 2, virus linfotrófico T humano de tipo 3, virus linfotrófico T humano de tipo 4, virus de la hepatitis A,
- 10 virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de Lassa, gripe A, los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de la gripe A, virus de la gripe B o la gripe B o protozoos tripanosomiales, incluyendo *Leishmania*. Más preferentemente, la enfermedad que implica la disfunción de leucocitos secundarios es infección por VIH y SIDA o leishmaniasis.
- 15 Afecciones y enfermedades ejemplificadas que pueden ser tratadas, prevenidas, atenuadas o mejoradas modulando la actividad de los leucocitos incluyen afecciones inflamatorias agudas o crónicas, incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, lupus, asma, reacciones alérgicas y enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, pero sin limitación, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, esclerosis lateral
- 20 amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome antisintetasa, alergia atópica, dermatitis atópica, anemia aplásica autoinmune, cardiomiopatía autoinmune, enteropatía autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendocrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmunitaria, uveítis autoinmune,
- 25 enfermedad de Balo/esclerosis concéntrica de Balo, enfermedad de Behçet, enfermedad de Berger, encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide ampolloso, cáncer, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad de las aglutininas frías, deficiencia del componente 2 del complemento, dermatitis de contacto, arteritis
- 30 craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn (incluyendo cualquiera de los dos tipos de enfermedad inflamatoria del intestino idiopática "IBD"), síndrome de Cushing, vasculitis cutánea leucocitoclástica, enfermedad de Deigo, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus inducido por fármacos, lupus eritematoso discoide, eccema, endometriosis, artritis relacionada con entesitis, fascitis eosinófila, gastroenteritis eosinófila, epidermolísis ampollosa
- 35 adquirida, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, fibrodisplasia osificante progresiva, alveolitis fibrosante (o fibrosis pulmonar idiopática), gastritis, penfigoide gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalopatía de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, también conocido como penfigoide gestacional, hidradenitis supurativa, síndrome de Hughes-Stovin,
- 40 hipogammaglobulinemia, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (véase la púrpura trombocitopénica autoinmunitaria), nefropatía por IgA, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, cistitis intersticial, artritis juvenil idiopática, también conocida como artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad por IgA lineal (LAD),
- 45 enfermedad de Lou Gehrig (también conocida como esclerosis lateral amiotrófica), hepatitis lupoide, también conocida como hepatitis autoinmunitaria, lupus eritematoso, síndrome de Majeed, enfermedad de Ménière, poliangeítis microscópica, síndrome de Miller-Fisher, véase el síndrome de Guillain-Barré, enfermedad del tejido conectivo mixto, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann, también conocida como pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (también enfermedad de Devic), neuromiotonía, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclonía-miclonía, tiroiditis de Ord, reumatismo
- 50 palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados con estreptococos), degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, pars planitis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, encefalomiелitis perivenosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis
- 55 esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, pioderma gangrenoso, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis recurrente, síndrome de Reiter, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, artritis reumatoide, fiebre reumática, sarcoidosis, esquizofrenia, síndrome de Schmidt, otra forma de APS, síndrome de Schnitzler, escleritis, esclerodermia, enfermedad del suero, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, enfermedad de Still, véase artritis reumatoide juvenil, síndrome
- 60 del hombre rígido, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, síndrome de Sweet, corea de Sydenham, véase PANDAS, oftalmía simpática, lupus eritematoso sintético, véase lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes"), trombocitopenia, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa (uno de los dos tipos de enfermedad inflamatoria del intestino idiopática "IBD"), enfermedad del tejido conectivo mixto no diferenciada distinta de la enfermedad del tejido conectivo
- 65 mixto, espondiloartropatía indiferenciada, vasculitis urticante, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

### 6.8.1 Neoplasias malignas hematológicas

En una realización preferida, el "conjugado de BAM" de la invención puede ser usado para el tratamiento o la mejora de varias neoplasias malignas hematológicas, tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide (o mielógena) crónica (CML), todas las formas de linfoma y mieloma y, en particular, todas las formas de leucemia mieloide (o mielógena) aguda (AML).

La AML es un grupo heterogéneo de enfermedades, caracterizada por la proliferación no controlada de células clonales precursoras neoplásicas y por el deterioro de la producción de hematopoyesis normal, que provoca neutropenia, anemia y trombocitopenia. Para fines pronósticos y terapéuticos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha proporcionado la siguiente clasificación amplia para la AML:

AML con ciertas anomalías genéticas, incluyendo

- AML con una translocación entre los cromosomas 8 y 21
- AML con una translocación o inversión en el cromosoma 16
- AML con cambios en el cromosoma 11
- APL (M3), que normalmente tiene una traslocación entre los cromosomas 15 y 17

AML con displasia multilineaje (está implicado más de un tipo de célula mieloide anormal)

AML relacionada con quimioterapia o radiación previa

AML no especificada de otro modo, incluyendo

- AML no diferenciada (M0)
- AML con maduración mínima (M1)
- AML con maduración (M2)
- Leucemia prolinfocítica, (M3),
- Leucemia mielocítica aguda (M4)
- Leucemia monoblástica aguda (M5a), leucemia monocítica aguda (M5b)
- Leucemia eritroide aguda (M6)
- Leucemia megacarioblástica aguda (M7)
- Leucemia basófila aguda
- Panmielosis aguda con fibrosis
- Sarcoma mieloide (también conocido como sarcoma o cloroma granulocítico)

Leucemias agudas no diferenciadas o bifenotípicas (leucemias que tienen características tanto linfocíticas como mieloides). En ocasiones se denomina ALL con marcadores mieloides, AML con marcadores linfocíticos o leucemias de linaje mixto.

Puede usarse cualquiera de los agentes quimioterapéuticos convencionales especificados anteriormente como grupo biológicamente activo conjugado a los péptidos transportadores de la invención para el tratamiento de la AML.

Preferentemente, para el tratamiento de la AML, el BAM se selecciona entre uno de los siguientes agentes quimioterapéuticos:

- antimetabolitos, tales como arabinósidos de citosina, incluyendo citarabina, análogos de purina tales como tioguanina, antifolatos, incluyendo trimetoprima y pemetred o análogos de pirimidina, incluyendo gemcitabina y fluorouracilo;
- inhibidores de topoisomerasa, tales como las antraciclinas, incluyendo daunorrubicina, adriamicina (doxorubicina), epirubicina, idarrubicina, anamicina y MEN 10755; los alcaloides de quinolina, incluyendo camptotecina, SN-38, DX-8951f, topotecán, 9-aminocamptotecina, BN 80915, irinotecán, DB 67, BNP 1350, exatecán, lurtotecán, ST 1481 y CKD 602; los análogos de podofilotoxina, etopósido y tenipósido y las antracenodionas, mitoxantrona y amsacrina u otros productos naturales, incluyendo azatioprina; brequinar; bisciclopéptidos de fenoxizona, tales como dactinomicina; glucopéptidos básicos, por ejemplo, bleomicina; glucósidos de antraquinona, tales como plicamicina (mitromicina); antracenodionas, por ejemplo, mitoxantrona; azirinopirrol indolionas, por ejemplo, mitomicina; inmunosupresores macrocíclicos, por ejemplo, ciclosporina, FK-506 (tacrolimus, prograf), rapamicina, etc.; y similares;
- agentes que interfieren con el ensamblaje de microtúbulos, tales como la familia de alcaloides de la vinca, incluyendo alcaloides de la vinca como vinblastina, vincristina; vinorelbina, vindesina; vindolina y vincamina; los taxanos y diterpenos, incluyendo paclitaxel y docetaxel,
- complejos metálicos, por ejemplo, cisplatino (cis-DDP), carboplatino, etc.; ureas, por ejemplo, hidroxurea; e hidrazinas, por ejemplo, N-metilhidrazina, trióxido de arsénico;
- retinoides, por ejemplo, vitamina A, ácido 13-cis-retinoico, isotretinoína, etc.; carotenoides, por ejemplo, beta-caroteno, vitamina D, etc.

- Cada vez más evidencias documentan que las neoplasias malignas mieloides, incluyendo las diversas formas de AML, están causadas por mutaciones genéticas que activan de manera constitutiva a las enzimas implicadas en la transducción de señales. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los conjugados de BAM de la invención pueden comprender un grupo BAM diseñado para tener como diana estas enzimas, mediadores aguas abajo de estas enzimas o una o más secuelas de su actividad constitutiva. Ejemplos no limitantes de dichas enzimas y/o efectores aguas abajo incluyen farnesil transferasa; factor de crecimiento endotelial vascular y otras proteínas angiogénicas; enzimas que contribuyen a la capacidad proliferativa y de supervivencia de los blastos de leucemia, tales como *FLT3* o *RAS*; enzimas que contribuyen a la alteración de la diferenciación hematopoyética, tales como inhibidores de HDAC, el gen antiapoptótico *BCL-2*, inhibidores de M-CSF, *af10*, *alox 12*, *arhgef12*, *arnt*, *axl*, *bax*, *bad*, *bcl*, *bcl3*, *bcl6*, *btg1*, *cav1*, *cbfb*, *cdc23*, *cdh17*, *cdx2*, *cebpa*, *clc*, *cr1*, *crebbp*, *dek*, *dleu1*, *dleu2*, *egfr*, *ets1*, *evi2a*, *evi2b*, *foxo3a*, *fus*, *gli2*, *gmps*, *hox11*, *hoxa9*, *irf1*, *kit*, *laf4*, *lcp1*, *ldb1*, *lmo1*, *lmo2*, *lyl1*, *madh5*, *mll3*, *mlt2*, *mlt3*, *mov1011*, *mtcp1*, *myc*, *nfb2*, *notch1*, *notch3*, *npm1*, *nup214*, *nup98*, *p53*, *pbx1*, *pbx2*, *pbx3*, *pbxp1*, *pitx2*, *pml*, *rab7*, *rgs2*, *runx1*, *set*, *sp140*, *tal1*, *tal2*, *tcl1b*, *tcl6*, *thra*, *tra* y *zfn1a1*.
- 15 En línea con esto, más recientemente, se han identificado dianas farmacológicas específicas de genotipo de las diversas formas de AML. Dichas terapias dirigidas incluyen, en particular, inhibidores de proteína quinasa, incluyendo inhibidores de tirosina quinasa (*Fit3*, *c-kit*, *BCR-ABL*), Aurora quinasa y otros componentes de las vías de señalización intracelular (por ejemplo, *Ras*).
- 20 En una realización preferida, el grupo biológicamente activo conjugado al grupo transportador de la invención puede ser un agente que interfiere con dicha transducción aberrante de señales, tales como inhibidores de farnesil transferasa, inhibidores de histona desacetilasa y del proteasoma, agentes antiangiogénicos, inhibidores de *FLT3*, inhibidores de la apoptosis o inhibidores de M-CSF.
- 25 Estos agentes pueden inhibir de manera selectiva un componente específico de la vía de señalización o pueden interactuar con varios componentes, tales como el inhibidor multiquinasa sorafenib.

Inhibidores de proteína quinasa que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen crizotinib, gefitinib, imatinib, erlotinib, pazopanib, sunitinib, sorafenib, dasatenib, lapatinib, lestaurtinib, nilotinib, ruxolitinib, tandutinib, vandetanib, cediranib, seliciclib, midostaurina, L-21649, ABT-869, dovitinib y PKC412, tipifarnib, AFG206, AFG210 y AHL196, AUZ454 y ATH686, SU5416 y SU6668.

Ejemplos no limitantes de BAM que pueden ser usados en el tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas distintas a la leucemia mieloide aguda de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento incluyen inhibidores de proteasa (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, marizomib), inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina), inhibidores de proteína quinasa expresadas principalmente en leucocitos (por ejemplo, fostamatinib) y fármacos modificadores epigenéticos (compuestos que actúan en la escritura y/o borrado del código epigenético, por ejemplo, vorinostat).

#### 40 **6.8.2 Afecciones inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias**

Las moléculas y compuestos de la invención también pueden ser usadas en el tratamiento o la prevención de afecciones inflamatorias; enfermedades o afecciones asociadas con enfermedades y trastornos autoinmunitarios; y/o en la mejora de los síntomas de dichas afecciones inflamatorias y/o enfermedades autoinmunitarias. Ejemplos no limitantes de afecciones que pueden ser tratadas con los compuestos y métodos de la invención incluyen encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome antisintetasa, alergia atópica, dermatitis atópica, anemia aplásica autoinmune, cardiomiopatía autoinmune, enteropatía autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendocrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmunitaria, uveítis autoinmune, enfermedad de Balo/esclerosis concéntrica de Balo, enfermedad de Behçet, enfermedad de Berger, encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide ampolloso, cáncer, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad de las aglutininas frías, deficiencia del componente 2 del complemento, dermatitis de contacto, artritis craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn (uno de los dos tipos de enfermedad inflamatoria del intestino idiopática "IBD"), síndrome de Cushing, vasculitis cutánea leucocitoclástica, enfermedad de Deigo, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus inducido por fármacos, lupus eritematoso discoide, eccema, endometriosis, artritis relacionada con entesitis, fascitis eosinófila, gastroenteritis eosinófila, epidermólisis ampollosa adquirida, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, fibrodisplasia osificante progresiva, alveolitis fibrosante (o fibrosis pulmonar idiopática), gastritis, penfigoide gastrointestinal, artritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalopatía de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, también conocido como penfigoide gestacional, hidradenitis supurativa, síndrome de Hughes-Stovin,

hipogammaglobulinemia, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (véase la púrpura trombocitopénica autoinmunitaria), nefropatía por IgA, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, cistitis intersticial, artritis juvenil idiopática, también conocida como artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad por IgA lineal (LAD), enfermedad de Lou Gehrig (también conocida como esclerosis lateral amiotrófica), hepatitis lupoide, también conocida como hepatitis autoinmunitaria, lupus eritematoso, síndrome de Majeeed, enfermedad de Ménière, poliangeítis microscópica, síndrome de Miller-Fisher, véase el síndrome de Guillain-Barré, enfermedad del tejido conectivo mixto, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann, también conocida como pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (también enfermedad de Devic), neuromiotonía, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclonía-mioclónia, tiroiditis de Ord, reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados con estreptococos), degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, pars planitis, pénfigo vulgar, anemia pernicioso, encefalomielitis perivenosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, pioderma gangrenoso, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis recurrente, síndrome de Reiter, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, artritis reumatoide, fiebre reumática, sarcoidosis, esquizofrenia, síndrome de Schmidt, otra forma de APS, síndrome de Schnitzler, escleritis, esclerodermia, enfermedad del suero, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, enfermedad de Still, véase artritis reumatoide juvenil, síndrome del hombre rígido, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, síndrome de Sweet, corea de Sydenham, véase PANDAS, oftalmía simpática, lupus eritematoso sintético, véase lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes"), trombocitopenia, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa (uno de los dos tipos de enfermedad inflamatoria del intestino idiopática "IBD"), enfermedad del tejido conectivo mixto no diferenciado distinta de la enfermedad del tejido conectivo mixto, espondiloartropatía indiferenciada, vasculitis urticante, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

ejemplos no limitantes de BAM que pueden ser usados en el tratamiento de dichas afecciones incluyen inhibidores de COX-2, prednisona, pazopanib, famotidina, dalfampridina, pegloticasa, esomeprazol, aspirina, celecoxib, diclofenaco, valdecoxib, rofecoxib, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, sulindaco, tolmetina, lansoprazol, meclofenamato, triamcinolona, metilprednisolona, betametasona, budesonida, prednisolona, hidrocortisona, dexametasona y cortisona.

### 35 **6.8.3 Enfermedades por protozoos y enfermedades infecciosas**

Las moléculas y los compuestos de la invención también pueden ser usadas en el tratamiento o la prevención de enfermedades y afecciones asociadas con infecciones por protozoos u otras afecciones infecciosas y/o la mejora de los síntomas asociados con las mismas. Ejemplos no limitantes de dichas enfermedades y afecciones que pueden ser tratadas con los compuestos y métodos de la invención incluyen infecciones por *Acinetobacter*, actinomicosis, enfermedad del sueño africana (tripanosomiasis africana), SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), amebiasis, anaplasmosis, ántrax, infección por *Arcanobacterium haemolyticum*, fiebre hemorrágica argentina, ascariasis, aspergilosis, infección por astrovirus, babesiosis, infección por *Bacillus cereus*, neumonía bacteriana, vaginosis bacteriana (BV), infección por *Bacteroides*, balantidiasis, infección por *Baylisascaris*, infección por el virus BK, piedra negra, infección por *Blastocystis hominis*, blastomicosis, fiebre hemorrágica boliviana, infección por *Borrelia*, botulismo (y botulismo infantil), fiebre hemorrágica brasileña, brucelosis, infección por *Burkholderia*, úlcera de Buruli, infección por calicivirus (norovirus y sapovirus), campilobacteriosis, candidiasis (moniliasis; aftas), enfermedad por arañazo de gato, celulitis, enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), chancroide, varicela, clamidia, infección por *Chlamydophila pneumoniae*, cólera, cromoblastomicosis, clonorquiasis, infección por *Clostridium difficile*, coccidioidomicosis, fiebre por garrapatas de Colorado (CTF), resfriado común (rinofaringitis viral aguda; coriza aguda), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHF), criptococosis, criptosporidiosis, larva cutánea migrante (CLM), ciclosporiasis, cisticercosis, infección por citomegalovirus, fiebre del dengue, dientamoebiasis, difteria, difilobotriasis, dracunculiasis, fiebre hemorrágica del Ébola, equinococosis, erliquiosis, enterobiasis (infección por oxiuros), infección por *Enterococcus*, infección por enterovirus, tifus epidémico, eritema infeccioso (quinta enfermedad), exantema súbito (sexta enfermedad), fasciolopsiasis, fasciolosis, insomnio familiar fatal (FFI), filariasis, contaminación alimentaria por *Clostridium perfringens*, infección por amebas libres vivas, infección por *Fusobacterium*, gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial), geotricosis, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), giardiasis, muermo, gnatostomiasis, gonorrea, granuloma inguinal (Donovanosis), infección por estreptococos del Grupo A, infección por estreptococos del Grupo B, infección por *Haemophilus influenzae*, enfermedad de las manos, los pies y la boca (HFMD), síndrome pulmonar por hantavirus (HPS), infección por *Helicobacter pylori*, síndrome hemolítico urémico (HUS), fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS), Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, Hepatitis E, herpes simplex, histoplasmosis, infección por anquilostoma, infección por bocavirus humano, arliquiosis por *Ehrlichia ewingii* humana, anaplasmosis granulocítica humana (HGA), infección por metaneumovirus humano, erliquiosis monocítica humana, virus del papiloma humano (HPV), infección por virus parainfluenza humano, himenolepiasis, mononucleosis infecciosa de Epstein-Barr (mono), influenza (gripe), isosporiasis, enfermedad de Kawasaki, queratitis, infección por

Kingella kingae, Kuru, fiebre de Lassa, legionelosis (enfermedad del legionario), legionelosis (fiebre de Pontiac), leishmaniasis, lepra, leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme (borreliosis de Lyme), filariasis linfática (elefantiasis), coriomeningitis linfocítica, malaria, fiebre hemorrágica de Marburgo (MHF), sarampión, melioidosis (enfermedad de Whitmore), meningitis, enfermedad meningocócica, metagonimiasis, microsporidiosis, molusco contagioso (MC), paperas, tifus murino (tifus endémico), neumonía por micoplasma, micetoma, miasis, conjuntivitis neonatal (oftalmía neonatal), (nueva) variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, nvCJD), nocardiosis, oncocercosis (ceguera de los ríos), paracoccidioidomicosis (blastomicosis sudamericana), paragonimiasis, pasteurellosis, enfermedad inflamatoria pélvica (PID), tos ferina (pertusis), peste, infección neumocócica, neumonía por *Pneumocystis* (PCP), neumonía, poliomielitis, infección por *Prevotella*, meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), leucoencefalopatía multifocal progresiva, psitacosis, fiebre Q, rabia, fiebre por mordedura de rata, infección por el virus sincitial respiratorio, rinosporidiosis, infección por rinovirus, infección por rickettsia, rickettsiosis pustulosa, fiebre del Valle del Rift (RVF), fiebre de las Montañas Rocosas (RMSF), infección por rotavirus, rubéola, salmonelosis, SARS (síndrome respiratorio agudo severo), sarna, esquistosomiasis, septicemia, shigelosis (disentería bacilar), culebrilla (herpes zóster), viruela (Variola), esporotricosis, contaminación alimentaria por estafilococo, infecciones por estafilococos, estrongiloidiasis, sífilis, teniasis, tétanos (Lockjaw), tiña de la barba (foliculitis), tinea capitis (tiña del cuero cabelludo), tinea corporis (tiña del cuerpo), tinea cruris (tiña inguinal), tinea manuum (tiña de la mano), tiña negra, tiña del pie (pie de atleta), tiña ungueal (onicomicosis), tiña versicolor (pitiriasis versicolor), toxocariasis (larva migrans ocular (OLM)), toxocariasis (larva migrans visceral (VLM)), toxoplasmosis, triquinosis, tricomoniasis, tricuriasis (infección por triquinosis), tuberculosis, tularemia, infección por *Ureaplasma urealyticum*, encefalitis equina venezolana, fiebre hemorrágica venezolana, neumonía vírica, fiebre del Nilo Occidental, piedra blanca (Tinea blanca), infección por *Yersinia pseudotuberculosis*, yersiniosis, fiebre amarilla y cigomicosis.

Ejemplos no limitantes de BAM que pueden ser usados en el tratamiento de dichas afecciones incluyen cloroquina, mefloquina, primaquina, clorhidrato de proguanilo, clorhidrato de proguanilo con atovaquona, pirimetamina, sulfadoxina, quinina, quinolina, doxiciclina, clindamicina, artesunato, diloxanida, metronidazol, tinidazol, clorhidrato de mepacrina, anfotericina, pentamidina, pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, atovaquona, trimetoprima-sulfametoxazol, trimetoprima, dapsona, atovaquona, isetionato de pentamidina, amodiaquina, cloroguanida, eflornitina, hidroxicloroquina, yodoquinol, antimoniato de meglumina, melarsoprol, nifurtimox, paromomicina, estibogluconato de sodio, suramina, triparasamida.

#### 6.8.4 VIH/SIDA

Está bien establecido que los leucocitos, en particular los macrófagos, desempeñan un papel crucial en la infección por VIH-1. Se encuentran entre las primeras células infectadas por VIH-1 y se ha propuesto que forman un reservorio de VIH-1 en las personas infectadas. También sirven como medio para diseminar el virus a otros tejidos, tales como el cerebro. Además, el virus puede almacenarse ahí permaneciendo escondido de anticuerpos potencialmente neutralizantes u otras formas de respuesta inmunitaria.

En vista de lo anterior, los grupos de transporte de la invención, que tienen como diana de manera selectiva a macrófagos y facilitan el transporte intracelular son ideales como grupos transportadores de agentes intracelulares contra el VIH.

Por lo tanto, el BAM que puede estar conjugado al grupo transportador de la invención puede ser, en particular

- un NRTI (inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la transcriptasa inversa) incluyendo zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, emtricitabina, abacavir y tenofovir, apricitabina, elvucitabina, OBP-601, amdoxovir, epivir, retrovir, *estavudina*, *zalcitabina*, AZT; estavudina, 4-Ed4T, amdoxovir, dexelvucitabina, DOT (dioxolano timidina), fosalvudina, GS-9131, GS-9148, IDX12899, IDX12989, quinolonas, racivir, tirovir, derivados de TSAO-T;
- un NNRTI (inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa), incluyendo nevirapina, delaviradme, efavirenz, etravirina y rilpivirina, etravirina, HBY097, IDX899, V026048, RDEA806, RDEA427, RDEA640, UK-435061; o
- un inhibidor de proteasa, incluyendo ritonavir, tipranavir, saquinavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir, fosamprenavir, atazanavir, lopinavir, darunavir (TMC-1 14), lasinavir y brecanavir (VX-385), GRL-02031, SPI-256.

#### 6.8.5 Agentes contra protozoos|Leishmaniasis

*Leishmania* son protozoos que pertenecen al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*. La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por vector que se transmite por los flebotomos. La infección en humanos está causada por aproximadamente 30 especies diferentes que infectan a mamíferos. Estas incluyen el complejo *L. donovani* con 3 especies (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*); el complejo *L. mexicana* con 3 especies principales (*L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*, *L. aethiopica*; y el subgénero *Viannia* con 4 especies principales (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, y *L. (V.) peruviana*). Las diferentes especies son morfológicamente indistinguibles, pero pueden diferenciarse mediante análisis isoenzimático, métodos moleculares o anticuerpos monoclonales.

*Leishmania* es responsable de varios tipos de enfermedades, incluyendo la leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea (de tipo localizado o difuso) y la leishmaniasis mucocutánea. Esta variabilidad de las características clínicas

es el resultado tanto de la diversidad de las especies de *Leishmania* y como de la respuesta inmunitaria de los hospedadores.

5 En seres humanos, así como en otros animales, el parásito se inocula a través de la piel en forma de un promastigoto flagelado extracelular por su vector de artrópodo. En su hospedador de mamífero, los promastigotos de *Leishmania* en primer lugar se evaden mediante lisis mediada por complemento hasta que son atrapados por un macrófago. Posteriormente, el promastigoto de *Leishmania* se diferencia en amastigotos, más resistentes, y permanece como patógeno intracelular obligado, infectando a las células hematopoyéticas del linaje de monocitos/macrófagos. El secuestro en el interior de las células del hospedador permite a *Leishmania* escapar a muchas de las respuestas  
10 inmunitarias que, de lo contrario, podrían dirigirse contra ella. Sin embargo, a fin de sobrevivir a las actividades antimicrobianas de su célula hospedadora y a fin de prevenir la activación de una respuesta inmunitaria eficaz, las diversas especies de *Leishmania* han desarrollado mediante evolución complejos mecanismos para subvertir la función normal de los macrófagos, en particular, los implicados en la vigilancia inmunitaria y la activación de macrófagos, a nivel de expresión de la proteína o del gen.

15 Además de reprimir las actividades microbicidas del macrófago hospedador, *Leishmania* inhibe la capacidad de la célula hospedadora para desplegar antígenos parasitarios a otros componentes del sistema inmunitario. Por lo tanto, *Leishmania* impide la activación de una respuesta inmunitaria eficaz inhibiendo la producción de una serie de citoquinas, en particular las implicadas en la respuesta inflamatoria (IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ])  
20 o en la activación de linfocitos T (IL-12)). La potente capacidad de *Leishmania* para bloquear la maquinaria antimicrobiana de los macrófagos permite al parásito evitar la respuesta inmunitaria innata inicial y crea un ambiente seguro para su proliferación. Además, la ubicación escondida dentro del macrófago hospedador es responsable en gran medida de la ausencia de una quimioterapia eficaz, ya que impide el acceso de fármacos terapéuticos.

25 Para potenciar la actividad contra la leishmaniasis y para reducir la toxicidad de la medicación, se han desarrollado sistemas de suministro de fármaco liposómicos a fin de actuar de manera selectiva en el sistema de fagocitos mononucleares. Por lo tanto, por ejemplo, se ha usado anfotericina B liposómica para tratar la leishmaniasis visceral.

30 No obstante, hasta la fecha, el antimonio (Sb) pentavalente, que se desarrolló hace más de 50 años, sigue siendo el tratamiento de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis, a pesar de su escasa eficacia y sus efectos secundarios. Por lo tanto, existe una gran necesidad de un agente eficaz contra la leishmaniasis, que tiene como diana de manera selectiva a los macrófagos hospedadores para aumentar la actividad contra la leishmaniasis y para reducir la toxicidad. Debido a su capacidad para tener como diana de manera específica a células mieloides, los compuestos de la invención pueden ser usados para transportar y suministrar agentes con actividad contra la leishmaniasis a las  
35 células hospedadoras de macrófagos infectadas.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de la invención, el BAM que puede estar conjugado para formar el conjugado de BAM de la invención puede ser un agente con actividad contra protozoos, incluyendo, pero sin limitación, cloroquina, mefloquina, primaquina, clorhidrato de proguanilo, clorhidrato de proguanilo con atovaquona, pirimetamina, sulfadoxina, quinina, quinolina, doxiciclina, clindamicina, artesunato, diloxanida, metronidazol, tinidazol,  
40 clorhidrato de mepacrina, anfotericina, pentamidina, pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, atovaquona, trimetoprima-sulfametoxazol, trimetoprima, dapsona, atovaquona, isetionato de pentamidina, amodiaquina, cloroguanida, eflornitina, hidroxiclороquina, yodoquinol, antimonio de meglumina, melarsoprol, nifurtimox, paromomicina, estibogluconato de sodio, suramina y triparasamida.

#### 45 **6.9 Composiciones farmacéuticas y su administración**

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas y compuestos de la invención, por ejemplo, conjugados de BAM. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho transportador o excipiente incluye, pero  
50 sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y/o combinaciones de los mismos. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la enfermedad dada que se esté tratando. La formulación se prepara para adecuar el modo de administración. En general, los métodos para administrar polipéptidos se conocen bien en la técnica y pueden aplicarse a la administración de los conjugados de la invención.

55 La administración es mediante cualquiera de las rutas normalmente usadas para introducir una molécula en contacto íntimo con la sangre. Se encuentran disponibles métodos de administración adecuados para dichos conjugados en el contexto de la presente invención, incluyendo las vías oral y parenteral. Aunque puede usarse más de una ruta para administrar una composición particular, una ruta en particular puede a menudo proporcionar una acción o reacción  
60 más inmediata y más eficaz que otra ruta.

Preferentemente, los conjugados de BAM de la invención se administran mediante modos de administración parenterales, en particular por medio intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico, subcutáneo, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar o intraarticular. Dichas vías de administración y dichas formulaciones adecuadas  
65 son conocidas generalmente por los expertos en la materia. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener

antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Los conjugados de polipéptido enlazador-polipéptido diana también pueden administrarse mediante liposomas.

Las moléculas y compuestos de la invención, solas o en combinación con otros componentes adecuados, también pueden prepararse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para su administración mediante inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma liofilizada para ser reconstituidas antes de su administración. Los tampones y las soluciones para la reconstitución de las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse junto con la formulación farmacéutica para producir composiciones acuosas de la presente invención para su administración.

La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras no deseadas cuando se administran a un animal o un ser humano. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan, en parte, por la composición particular que se esté administrando, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una gran variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica y pueden formularse uno o más conjugados de la invención en composiciones farmacéuticas mediante métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (2005); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokiaer y L. Hovgaard. Eds., Taylor y Francis (2000); y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más conjugados de BAM de la invención se prueban opcionalmente en uno o más modelos de enfermedad animal *in vitro* y/o *in vivo*, para confirmar la eficacia, el metabolismo tisular y para estimar las dosis, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, se entiende que la dosis adecuada de una composición de acuerdo con la presente invención dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Sin embargo, la dosis se adapta al sujeto individual, como puede ser determinada por un experto en la materia, sin experimentación indebida. La dosis total del agente terapéutico puede administrarse en múltiples dosis o en una sola dosis. En determinadas realizaciones, las composiciones se administran solas, en otras realizaciones, las composiciones se administran junto con otros agentes terapéuticos dirigidos a la enfermedad o dirigidos a otros síntomas de la misma.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, es suficiente para proporcionar una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente con el paso del tiempo o, por ejemplo, para inhibir la infección por un patógeno, para reducir o prevenir los síntomas de una patología u otra actividad adecuada, dependiendo de la aplicación. La dosis es determinada según la eficacia de una composición/formulación particular y la actividad, estabilidad o semivida en suero del conjugado de polipéptido-BAM empleado y el estado del paciente, así como el peso corporal o el área superficial del paciente que se vaya a tratar. El tamaño de la dosis es determinado también según la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de una composición/formulación particular o similares en un paciente concreto.

La invención también se refiere a los siguientes puntos:

Punto 1, Una molécula o compuesto que comprende o consiste en una de las siguientes estructuras consenso que comprenden L y D-aminoácidos:

Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>; o  
 (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>;  
 en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10;  
 en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1; en donde

(a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o

(b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;



en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que

(a) consiste en una cadena de péptido de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o

(b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ;

en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que

(a) consiste en un solo resto aminoacídico que puede ser cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o

(b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ;

y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico

(a) en donde SP<sub>B</sub> y SP<sub>C</sub> representan cada uno un solo resto aminoacídico que puede estar seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o

(b) que separa los restos aminoacídicos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ .

Punto 2, La molécula o el compuesto de acuerdo con el punto 1, en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ; (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ; y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico que separa los restos aminoacídicos adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ .

Punto 3, La molécula o el compuesto del punto 1 o 2, en donde uno o más de dichos enlazadores químicos es un péptido beta, una estructura basada en azúcar-aminoácidos, un peptidomimético en horquilla beta, un mimético en hélice alfa o un ciclótido.

Punto 4, La molécula o el compuesto del punto 1, en donde (SP<sub>A</sub>) representa una cadena de péptido que consiste en tres restos aminoacídicos, cada uno seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; y en donde (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) representan cada uno un solo resto aminoacídico que puede seleccionarse independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina.

Punto 5, La molécula o el compuesto de acuerdo con el punto 1 o 4, en donde (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en conjunto contienen no más de 3 restos de alanina.

Punto 6, La molécula o el compuesto de acuerdo con el punto 1, 4 o 5, en donde (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en conjunto no contienen restos de prolina.

Punto 7, La molécula o compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 y 4 a 6, en donde (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en conjunto incluyen uno o más aminoácidos seleccionados entre Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile y Leu.

Punto 8, La molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 y 4 a 7, en donde (SP<sub>B</sub>) representa un D-aminoácido.

Punto 9, La molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde LD<sub>10</sub> representa L o D-histidina.

Punto 10, La molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde XD<sub>11</sub> representa D-histidina.

Punto 11, La molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, en donde m tiene un valor de 1.

Punto 12, La molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde n tiene un valor de 0.

Punto 13, La molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 o 4 a 8 que tiene la secuencia

RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 1);  
 RYFvRIKYRh (SEQ ID NO: 2);  
 RYFvRIKARh (SEQ ID NO: 3);  
 RAAvRAKYRh (SEQ ID NO: 4);

RAAvRIKYRh	(SEQ ID NO: 5);
RSTqRYRVRh	(SEQ ID NO: 6);
RSTqRYKVRh	(SEQ ID NO: 7);
RGGgRGKGRh	(SEQ ID NO: 8);
RHHhRHKHRh	(SEQ ID NO: 9);
RVVvRVKVRh	(SEQ ID NO: 10);
RLlIRLKLrh	(SEQ ID NO: 11);
RMMmRMKMRh	(SEQ ID NO: 12)
RlllRIKIRh	(SEQ ID NO: 13);
RYFVRIKYR	(SEQ ID NO: 14);
RYFvRIKYR	(SEQ ID NO: 15); o
RYFVRiKYR	(SEQ ID NO: 16).

Punto 14, La molécula o el compuesto de uno cualquiera de los puntos 1 a 13, conjugado además a un grupo biológicamente activo (BAM).

5 Punto 15, El conjugado de BAM del punto 14, en donde dicho BAM se conjuga al extremo de dicha estructura consenso de acuerdo con una de las siguientes estructuras consenso:

(BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM); o

10 (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM)  
 en donde (BAM) representa un grupo biológicamente activo;  
 en donde (ENLACE) representa un grupo enlazador opcional;  
 en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina  
 y n tiene un valor de 0 a 10;

15 en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1;

en donde

20 (a) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina o  
 (b) Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan D-arginina; y X representa D-lisina o D-arginina;

en donde (SP<sub>A</sub>) representa un enlazador químico que

25 (a) consiste en una cadena de péptido de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto puede estar  
 seleccionado independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina  
 o L-lisina; o  
 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ;

en donde (SP<sub>C</sub>) representa un enlazador químico que

30 (a) consiste en un solo resto aminoacídico que puede ser cualquier resto de aminoácido distinto de D-arginina,  
 D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) separa los restos aminoacídicos adyacentes por  $7,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$ ;

35 y en donde (SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>) o su inversa, (SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>) representa un enlazador químico

(a) en donde SP<sub>B</sub> y SP<sub>C</sub> representan cada uno un solo resto aminoacídico que puede estar seleccionado  
 independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; o  
 (b) que separa los restos aminoacídico adyacentes Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>5</sub> o Arg<sub>5</sub> y Arg<sub>9</sub> por  $12,9 \pm 1,5 \text{ \AA}$ .

40 Punto 16, El conjugado de BAM del punto 15, en donde el grupo enlazador (ENLACE) es L o D-Glu.

Punto 17, El conjugado de BAM de uno cualquiera de los puntos 14 a 16, en donde el BAM se conjuga a Arg<sub>1</sub> o  
 Arg<sub>9</sub> mediante un enlace covalente amida N-terminal o éster C-terminal.

45 Punto 18, El conjugado de BAM del punto 14, en donde dicho BAM se conjuga a un resto aminoacídico y/o a un  
 grupo químico dentro de (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) o (SP<sub>C</sub>).

Punto 19, El conjugado de BAM del punto 16, en donde dicha conjugación es o bien conjugación directa a un resto  
 interno de dicha secuencia de péptido o indirecta mediante un grupo enlazador.

50 Punto 20, El conjugado de BAM de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 14 a 19, en donde el BAM es un

mono o polisacárido, un agente citotóxico, un agente antineoplásico, un agente antiinflamatorio, un agente antivírico, un agente antibacteriano o un agente para el tratamiento de infecciones por protozoos.

5 Punto 21, El conjugado de BAM de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 14 a 19, en donde el BAM es desoxirribosa o ribosa.

Punto 22, Una composición farmacéutica que comprende la molécula o el compuesto del punto 14 o el conjugado de BAM de uno cualquiera de los puntos 15 a 21.

10 Punto 23, La composición farmacéutica del punto 22 para uso en el tratamiento de trastornos que implican leucocitos, seleccionados entre enfermedad neoplásica, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad por inmunodeficiencia, e infecciones víricas, bacterianas, por protozoos o parasíticas.

15 Punto 24, La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 22 para uso en el tratamiento del VIH, virus de Epstein Barr, morbillivirus, paramyxovirus, rubivirus, virus del herpes, virus del dengue, virus del herpes simple, parvovirus, virus sincitial respiratorio, virus variola, varicela, flavivirus, virus linfotrófico T humano, virus de la hepatitis A, B, C, D o E, virus de Lassa o virus de la gripe.

20 Punto 25, La composición farmacéutica del punto 22 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en la que los leucocitos tienen una implicación fisiopatológica: neutrofilia, neutropenia, leucopenia, basopenia, basofilia, eosinopenia, eosinofilia, síndrome hipereosinófilo idiopático, leucocitosis linfocítica, linfocitosis, linfocitopenia, monocitosis, monocitopenia, anomalía de May Hegglin, anomalía de Pelger-Huet, anomalía de Alder-Reilly, síndrome de Chedial-Higashi, síndrome de Job (hiper-IgE), síndrome de los leucocitos perezosos, deficiencia de C3 congénita, enfermedad granulomatosa crónica, leucocitos, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiencia benigna de mieloperoxidasa, enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa, síndrome de DiGeorge, síndrome de Nezelof, agammaglobulinemia infantil ligada al sexo, hipogammaglobulinemia variable común, mucopolisacaridosis, lipidosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, gangliosidosis; Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Krabbe, metacromática, leucodistrofia, enfermedad de Wolman, leucemia, leucemia linfática aguda (L1, L2, L3), leucemia linfática crónica, leucemia mielógena aguda (AML), AML no diferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2), leucemia promielocítica (M3), leucemia mielocítica (M4), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), leucemia mielógena crónica.

35 Punto 26, La composición farmacéutica del punto 22 para uso en el tratamiento de la leishmaniasis.

Punto 27, Uso de la molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 14 para facilitar el transporte de una molécula biológicamente activo al interior de células mieloides.

40 Punto 28, Uso de la molécula o el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 14 para la preparación de un conjugado de fármaco-péptido.

45 El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en este documento, serán obvias para los expertos en la técnica. Dichas modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se citan varias publicaciones, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en su totalidad.

## 50 7. Ejemplos

### 7.1 Péptido que se une a C4S

55 Se modeló en una simulación informática una aproximación de la interacción del péptido TAT con C4S. La simulación modeló las moléculas de péptido TAT y C4S en conformación extendida, que es la forma más común de estas moléculas en solución. Los resultados del modelo indicaron que los restos de Arg de TAT correspondientes a las argininas en las posiciones 1, 5 y 9 de los péptidos nueve-meros de acuerdo con la invención (por ejemplo, de acuerdo con la secuencia Arg1-X2-X3-X4-Arg5-X6-X7-X8-Arg9 (SEQ ID NO: 21 sujeta a las reglas de la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22 sujeta a las reglas de la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20)) estaban espaciados a intervalos favorables para interactuar de manera óptima con los sulfatos repetitivos de C4S. La distancia de los restos de Arg de TAT fue de 13,2 Å, que se ajusta de manera óptima con el espaciado repetido de los sulfatos en C4S, que están separados por 12,9 Å (véase la Fig. 1). Además, la lisina o arginina en las posiciones equivalentes X3 o X7 se encontrarían a aproximadamente 6,6 Å del resto de Arg1 o Arg9, interactuando de manera óptima con el carboxilato ubicado a 7,5 Å de los sulfatos en C4S (Fig. 1). El modelo implicaba que las secuencias de TAT han de encontrarse en conformación extendida para interactuar con C4S y excluye cualquier restricción helicoidal para una unión eficaz y selectiva.

También se modeló en una simulación informática una aproximación de la interacción de un péptido de la invención con C4S. Tal como se había predicho por los resultados del modelo descrito anteriormente, los resultados de la simulación indicaron que las argininas en las posiciones 1, 5 y 9 de los péptidos nueve-meros de acuerdo con la invención mostraron interacciones favorables con los sulfatos en los azúcares de C4S (por ejemplo, en las posiciones 1, 3 y 7 en la estructura simulada representada en la figura 2. Adicionalmente, una lisina en la posición 3 del péptido nueve-mero fue capaz de interactuar con el carboxilato en el azúcar en la posición 2 del C4S, tal como se modela en la figura 2.

Las interacciones favorables de las posiciones 1, 5 y 9 de los péptidos de direccionamiento de la invención con la molécula de C4S se representan esquemáticamente en la figura 3, usando el péptido vírico TAT. Tal como se determinó mediante el modelo y como se representa en la figura 3, solo Arg en las posiciones 1, 5 y 9 (bolas en la figura 3) y Lys en 3 están involucradas en las interacciones con los sulfatos en los azúcares de C4S en 1, 3 y 7 y el carboxilato en la posición 2 en C4S, respectivamente. Además, debido a que las estructuras son simétricas, Lys +3 puede moverse a +7 con resultados idénticos.

La unión de los péptidos nueve-meros de la invención a C4S predicha por los modelos, en particular, en comparación con la unión a otros proteoglicanos fue evaluada usando un protocolo de ELISA modificado. Las placas de ELISA se recubrieron durante una noche con 1 mg/ml de heparán sulfato (HS), condroitín-4-sulfato (C4S), condroitín-6-sulfato (C6S) o ácido hialurónico (HA) en PBS. Después, se lavaron los pocillos con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 1 mg/ml de un péptido ejemplificado de la invención que tiene la secuencia RYFvRIKYRh ("RYF"; SEQ ID NO: 2) o un péptido TAT convencional. Después, se lavaron exhaustivamente las placas con PBS y posteriormente se fotografiaron con un microscopio de luminiscencia LUMASCOPE™. Después, se cuantificaron las imágenes usando el programa informático ImageJ (figura 4). Los resultados presentados en la figura 4 demuestran, que a diferencia del péptido de TAT convencional (Fig. 4B), el péptido RYF de acuerdo con la invención se une específicamente al proteoglicano C4S y en particular, se une de manera selectiva a C4S frente a los otros proteoglicanos ensayados (fig. 4A).

Se usó el mismo protocolo ELISA para examinar el impacto de alterar la quiralidad de los restos aminoacídicos de las posiciones 1, 5, 9 y 3 o 7 en la unión de los péptidos a C4S. La figura 5 demuestra que solo se mantuvo una alta actividad de unión en los casos en los que todas las posiciones de Arg1, Arg5, Arg9 y Arg/Lys3 o Arg/Lys7 tenían la misma quiralidad (es decir, todas estas posiciones eran o bien D-aminoácidos o todas eran L-aminoácidos). En la figura 5, una letra mayúscula indica un enantiómero L y una letra minúscula indica un enantiómero D.

A continuación, se usó el mismo ELISA modificado para investigar el impacto de la carga neta del péptido en la unión selectiva a C4S. Los resultados en la figura 6 demuestran que el número de restos cargados negativamente en las "posiciones libremente seleccionables" del péptido se correlacionó directamente con la unión no específica a proteoglicanos y, que la reducción del número de restos cargados negativamente en estas posiciones aumentó la especificidad y/o selectividad por C4S.

## 7.2 Unión de péptido a C4S como se expresa en la superficie celular

Tal como se explica a lo largo de la descripción, las presentes moléculas son capaces de unirse de manera selectiva a C4S frente a otros proteoglicanos. La selectividad de unión de un péptido de la invención conjugado a FITC, RYFvRIKYRh ("RYF"; SEQ ID NO: 2) se evaluó en células que expresan C4S (células CHO) y células que carecen de C4S (células Sog9; deficientes para condroitín 4-o-sulfotransferasa 1 (C4ST-1, también conocido como CHST11). Las células Sog9 (C4ST-) y CHO se incubaron durante 24 horas en presencia del péptido RYF (secuencia: RYFvRIKYRh) (2,5 M). Después, las células se lavaron 3x en PBS antes de ser fijadas en metanol-acetona (1:1) y se fotografiaron con un microscopio de luminiscencia LUMASCOPE™. La figura 7 demuestra que el péptido RYF de la invención no se une a las células Sog9 que carecían de C4S; por el contrario, las células CHO que expresan C4S mostraron una unión intensa y uniforme.

Se usó el mismo procedimiento de microscopía de fluorescencia para evaluar la unión del péptido FITC-RYF a células que expresan C4S pretratadas con clorato. El clorato es un inhibidor de las sulfotransferasas y, por lo tanto, el tratamiento con clorato reduce o inhibe la expresión de C4S. Se trataron macrófagos con 0, 3, 10 o 30 μM de clorato durante 16 horas antes del lavado, la incubación con péptido RYF (SEQ ID NO: 2) y la toma de fotografías, tal como se ha descrito anteriormente. La figura 8 demuestra que la unión de RYF (SEQ ID NO: 2) se correlacionó con la expresión de sulfato de condroitina.

Los experimentos mostrados en las figuras 7 y 8 revelaron que los péptidos de la invención eran altamente selectivos para C4S frente a otros proteoglicanos. Por lo tanto, los péptidos permiten tener como diana específica células que expresan exclusivamente C4S o altos niveles de C4S en relación con otros proteoglicanos. La enzima primaria responsable de la 4-sulfatación de la condroitina y por lo tanto, de la producción de C4S, es CHST11. Los datos de expresión de las matrices Atlas revelaron que el gen CHST11 se expresa preferentemente en células del linaje leucocitario (figura 9). Por consiguiente, los péptidos y métodos de la invención permiten preferencialmente tener como diana específicamente a leucocitos.

### 7.3 Uso de péptidos de la invención como molécula transportadora para un agente terapéutico

Se examinó la capacidad de los péptidos de la invención para actuar como grupos transportadores y la dependencia de los niveles y del espaciado de los restos de D-aminoácido mediante la liberación del péptido de un grupo de FITC debido a extractos de macrófagos. Se incubó 1 µg de péptidos marcados con FITC de acuerdo con la invención con diferentes niveles y espaciado de D-aminoácidos durante hasta 48 horas en extractos de macrófagos "en bruto" (véase, por ejemplo, J Exp Med. 129(1969), 227-245) a 37 °C. Junto con FITC libre como control, se colocaron sobre papel de celulosa 0,5 µg de péptidos (Whitman n.º 1) antes de someterlos a cromatografía (en capa fina) usando n-butanol, ácido acético, agua (4:1:1) como disolvente. Los 0,5 µg restantes de las muestras se usaron para el análisis por HPLC-EM/EM. La leyenda para los péptidos usados en la figura 10 es: los péptidos 1, 5 y 6 tienen la secuencia consenso: RXXRXXXRh; los péptidos 14, 15 y 16 tienen la secuencia consenso: RXXRXXXRh; los péptidos 23, 24 y 25 tienen la secuencia consenso: rXXrXXr (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/072228). La conjugación entre los péptidos y FITC se efectuó a través de un enlace peptídico covalente normal al a.a. N-terminal de los péptidos. No se observó degradación para los péptidos 23, 24 y 25 debido a la conjugación al "r" N-terminal ("d"-aminoácido). La cantidad de FITC libre liberada por los péptidos varía del 100 % (n.º 5) (consenso: RXXRXXXRh) al 30 % (n.º 15) (consenso: RXXRXXXRh). Los datos indicaron que la inclusión de un D-aminoácido en la posición 4 del péptido puede modular la estabilidad y su capacidad para liberar el grupo BAM libre.

También se examinó el uso del péptido ejemplificado de la invención como grupo transportador en un ensayo de proliferación celular. Las células en bruto derivadas de macrófagos se incubaron durante 48 horas con 2,5 µM del análogo de nucleósido indicado o el análogo como conjugado con el péptido RYF en presencia de rojo de fenol. Los cultivos que contienen células en división viran a medio transparente, mientras que el medio de los cultivos que contienen células no en división permanece oscuro (compuestos activos). Las imágenes de los cultivos se presentan en la figura 11A. También se determinó el porcentaje de crecimiento midiendo el contenido relativo de LDH (Figura 11B). El experimento demostró que los conjugados de péptido-citotóxico de la invención eran capaces de eliminar células de macrófago tumoral (es decir, células en bruto derivadas de macrófagos de macrófagos) y que el péptido era capaz de transportar el agente citotóxico al interior de la célula, convirtiendo a los compuestos ineficaces en agentes citotóxicos eficaces. Por ejemplo, los compuestos "ribo" y "tg" (tioguanina) no tienen efecto a la concentración ensayada (2,5 µM), pero se vuelven potentemente citotóxicos cuando se conjugan a un transportador peptídico ejemplar de la invención (es decir, RYF).

Se repitió el experimento para investigar los efectos del enlace L o D en las propiedades citotóxicas del grupo BAM. Las células se incubaron con 3' amino β-D-arabinofuranósido, solo o en forma de conjugado con el péptido de RYF. Tal como demuestra la figura 12, el compuesto solo se internalizó cuando estaba presente en forma de conjugado. Adicionalmente, se observó que sorprendentemente solo el uso del resto enlazador D (es decir, "e" representa ácido D-glutámico) era citotóxico. Esto demuestra que el enlace a la posición 3' del azúcar de nucleósido mediante un enantiómero L (es decir, un L-aminoácido) puede ser degradado por proteasas, convirtiendo el nucleósido modificado en uno "normal" (es decir, con un grupo -OH en la posición 3', que no actúa como un terminador de cadena). Sin embargo, una vez que la posición 3' se conjuga a un D-enantiómero, no puede ser degradado por una proteasa y una vez que se ha incorporado a la hebra de ADN, funcionará para prevenir la elongación adicional del ADN.

Se repitió el experimento con 3'AdT (3' amino desoxitimidina) y 3' amino β-D-arabinofuranósido (Ribo). Las células se incubaron con cada uno de los compuestos solos o en forma de conjugado enlazado en la posición N-terminal al péptido RYF a través de L-Glu (E) o D-Glu (e). Después, se incubaron las células durante 72 h antes de medirse el contenido de LDH. La figura 13 demuestra que el enlace con el enantiómero D, ácido D-glutámico ("e"), convierte los compuestos inactivos en unos altamente citostáticos.

Se llevó a cabo un ensayo similar usando células MOLT4. Se incubaron células MOLT4 durante 5 días con los compuestos indicados o con los compuestos conjugados con el péptido PYF. Las células MOLT4 se agregan entre sí, permitiendo de este modo una fácil visualización del crecimiento celular. La figura 14 demuestra que, de manera similar a las células en bruto derivadas de macrófagos, los conjugados citotóxicos de RYF eliminan células tumorales *in vitro*.

### 7.4 Modelado de la interacción de C4S-TAT

Los estudios de mutagénesis de TAT tal como se describen en el presente documento demostraron que los restos Arg1, Lys/Arg 3 o 7, Arg5 y Arg9 fueron los restos más importantes para la unión a C4S. Además, la comparación de las estructuras en 3D de TAT y C4S, en sus conformaciones extendidas, reveló que la distancia media entre las cadenas laterales n y n+3 de TAT es muy próxima a la de los grupos sulfato y carboxilato de los restos n y n+1 de C4S (figura 15).

Estos hallazgos revelaron que TAT y C4S se unen probablemente debido a las interacciones electrostáticas favorables entre el par de restos 1/n; 3/n+1; 5/n+2; 7/n+3; y 9/n+4 de TAT y C4S, respectivamente. En los pares A/B citados, A y B designan restos de TAT y C4S, respectivamente; véase, por ejemplo, las figuras 15 y 16, que proporcionan esquemas de las moléculas de TAT y C4S, en donde los restos se indican de acuerdo con la numeración usada en el presente documento. Las interacciones favorables entre estos conjuntos de restos pueden explicarse mediante 2 mecanismos (que no son necesariamente mutuamente excluyentes), dependiendo de si Arg1 de TAT podía unirse a

un grupo azúcar que porta un grupo sulfato o carboxilato.

Debido a la naturaleza, el tamaño y la flexibilidad de los dos miembros, no fue posible identificar el modo de unión más probable usando programas informáticos de acoplamiento. Por lo tanto, se usó una estrategia que consistía en (i) comenzar a partir de los confórmers en 3D extendidos de ambas moléculas, (ii) posicionar manualmente las moléculas para formar los 3 contactos adyacentes tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, 3/n+1, 5/n+2, 7/n+3); (iii) llevar a cabo un total de 600 ns de simulaciones de dinámica molecular (MD) a 300 K mientras se mantiene el triplete de interacciones seleccionado; y, finalmente, (iv) calcular si las nuevas interacciones podrían emerger durante las simulaciones de MD y con qué frecuencia. De manera significativa, al inicio de la simulación de MD, no se producen interacciones distintas de las interacciones de partida seleccionadas entre TAT y C4S.

El razonamiento que respalda esta estrategia es que, en caso de que sea correcto el esquema de interacción formado por cinco pares principales de restos que interactúan y si, por ejemplo, Arg1 de TAT se une preferentemente a un resto sulfatado de C4S, entonces, una simulación de MD que parte de un complejo con únicamente el triplete que interactúa (1/n, 3/n+1, 5/n+2) debe dar lugar a la formación espontánea de interacciones más preferidas, por ejemplo, 7/n+3 y 9/n+4, pero solo si el resto n de C4S es un resto sulfatado.

Las interacciones entre TAT y C4S se modelaron usando el paquete de modelado molecular CHARMM, versión c36b1 (Brooks et al., *J. Comput. Chem.* 30(2009), 1545-1614). El péptido TAT (secuencia: RKKRRQRRR) se describió usando los campos de fuerza de todos los hidrógenos de CHARMM22 (Mackerell et al., *J. Phys. Chem. B* 102(1998), 3586-3616), mientras que la topología y los parámetros se obtuvieron usando SwissParam para la molécula C4S (Zoete et al., *J. Comput. Chem.* 32(2011), 2359-2368). La molécula de C4S se modeló para que contuviese 10 restos de azúcar, por ejemplo, como se representa esquemáticamente en la figura 16.

Los puntos de partida de la simulación de MD se generaron posicionando manualmente TAT y C4S, usando el programa de visualización de quimeras UCSF para formar los esquemas de interacción de interés, es decir, que implican tres restos consecutivos de C4S y 3 restos de TAT (por ejemplo, los restos 1, 3, 5 o 3, 5, 7 o 5, 7, 9) (Pettersen et al., *J. Comput. Chem.* 25(2004), 1605-1612). Para mantener la interacción entre los pares de restos de TAT/C4S durante la simulación de MD, se aplicó una restricción de distancia "NOE" a los mismos: RMIN y RMAX se ajustaron a 5 y 7 Å, respectivamente; y KMIN se ajustó a 1000 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Posteriormente se minimizó el sistema usando 5000 etapas de ABNR. Por último, para cada esquema de interacción inicial, se llevó a cabo un conjunto de 30 simulaciones de MD independientes, cada una de 20 ns de longitud, a 300K para comprobar si podían producirse interacciones adicionales entre C4S y TAT. El efecto del disolvente se estimó mediante el modelo de solvación implícito FACTS, con una constante dieléctrica de 1 para el soluto. Para cada simulación de MD, se extrajeron 1000 marcos, separados regularmente, del archivo de trayectoria. Para cada marco, se identificaron pares de restos que interactuaban como aquellos que tenían átomos pesados a una distancia menor de 5 Å. Por último, la frecuencia de existencia de cada par de restos posible que interactúan se promedió entre todos los marcos extraídos de las 30 simulaciones de MD de cada grupo.

La figura 17 proporciona dos ejemplos de esquemas de interacción formados durante las simulaciones de MD partiendo de (A) los 3 contactos formados por los restos 1/4, 3/5 y 5/6 o (B) a partir de los 3 contactos formados por los restos 3/4, 5/5 y 7/6 entre las moléculas de TAT y C4S, respectivamente. Tal como se puede observar, durante las simulaciones de MD ilustradas en (A), el sistema formó interacciones espontáneamente entre el extremo C-terminal de TAT y los restos con número de posición elevado de C4S (véase, por ejemplo, la figura 18 A y B), creando en particular los pares de interacción 7/7 y 9/8, que se esperaban de acuerdo con la hipótesis anteriormente mencionada. Por el contrario, en las simulaciones de MD ilustradas en (B), solo se formó un número limitado de nuevas interacciones. De manera significativa, no se formaron las dos interacciones esperadas 1/3 y 9/7. Curiosamente, en las simulaciones de MD ilustradas en (A), el esquema de interacción corresponde a uno donde se espera que Arg1 interactúe con un resto sulfatado de C4S, mientras que en las simulaciones de MD correspondientes a (B), se esperaba que Arg1 interactuase con un resto carboxilado de C4S.

Se llevaron a cabo varios grupos distintos de simulaciones, cada uno usando diferentes esquemas de interacción. En todos los casos donde el esquema implicó la interacción de Arg1 con un resto sulfatado de C4S, se produjeron de manera espontánea prácticamente todas las interacciones esperadas de acuerdo con la hipótesis anteriormente mencionadas durante la simulación de MD. Por el contrario, las interacciones esperadas no se produjeron cuando el esquema inicial implicó una interacción entre Arg1 y un resto de C4S carboxilado. Los resultados de las simulaciones respaldan la hipótesis de que TAT y C4S interactúan debido a interacciones electrostáticas favorables entre el par de restos 1/n, 3/n+1, 5/n+2, 7/n+3 y 9/n+4, donde los restos n, n+2 y n+4 de C4S son grupos sulfato y el resto n+1 y n+3 son grupos carboxilato.

## 7.5 Uso de péptidos de la invención como molécula transportadora en múltiples líneas celulares

Se investigó el uso de péptidos de la invención como moléculas transportadoras en un panel de exploración de líneas celulares de cáncer humanas. Se cultivaron las líneas celulares tumorales humanas del panel de exploración de cáncer en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 5 % y L-glutamina 2 mM. Para un experimento de exploración típico, las células fueron inoculadas en placas de microtitulación de 96 pocillos en volúmenes de 100 µl a densidades

de siembra en el intervalo de 5.000 a 40.000 células/pocillo, dependiendo del tiempo de duplicación de las líneas celulares individuales. Tras la inoculación de células, las placas de microtitulación fueron incubadas a 37 °C, CO2 al 5 %, aire al 95 % y una humedad relativa de 100 % durante 24 h antes de la adición de fármacos experimentales.

- 5 Después de 24 h, dos placas de cada línea celular fueron fijadas *in situ* con TCA para proporcionar una medida de la población celular en el momento de la adición del fármaco (Tz). Los agentes terapéuticos experimentales se solubilizaron en dimetilsulfóxido a 400 veces la concentración de ensayo máxima deseada y se almacenaron congeladas antes de su uso. En el momento de la adición del agente terapéutico, se descongeló una alícuota de concentrado congelado y se diluyó a dos veces la concentración de ensayo máxima final deseada usando medio
- 10 completo con 50 µg/ml de gentamicina. Se llevaron a cabo cuatro diluciones seriadas de factor 10 o ½ log para proporcionar un total de cinco concentraciones de ensayo más control. Se añadieron alícuotas de 100 µl de las diferentes diluciones a los pocillos de microtitulación adecuados, que ya contenían 100 µl de medio, dando como resultado las concentraciones de ensayo final deseadas.
- 15 Después de la adición del compuesto de ensayo, las placas fueron incubadas durante 48 h adicionales a 37 °C, CO2 al 5 %, aire al 95 % y una humedad relativa del 100 %. Para células adherentes, el ensayo se terminó mediante la adición de TCA frío. Las células fueron fijadas *in situ* mediante la adición cuidadosa de 50 µl de TCA al 50 % (p/v) (concentración final, TCA al 10 %) y se incubaron durante 60 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las placas cinco veces con agua corriente y se secaron al aire. Se añadió solución de sulforrodamina B (SRB) (100 µl) al 0,4 % (p/v) en ácido acético al 1 % a cada pocillo y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, se retiró el tinte no unido lavando cinco veces con ácido acético al 1 %, seguido de secado al aire. La tinción unida se solubilizó posteriormente con base trizma 10 mM y se leyó la absorbancia en un lector de placas automatizado a una longitud de onda de 515 nm. Para la suspensión de células, la metodología fue la misma, salvo por que el ensayo se terminó fijando las células asentadas al fondo de los pocillos añadiendo
- 20 cuidadosamente 50 µl de TCA al 80 % (concentración final, TCA al 16 %). Usando las siete medidas de absorbancia [tiempo cero, (Tz), control de crecimiento, (C) y prueba de crecimiento en presencia de compuesto a los cinco niveles de concentración (Ti)], se calculó el porcentaje de crecimiento en cada uno de los niveles de concentración de compuesto. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó como:

30 
$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ para concentraciones para las que } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ para concentraciones para las que } Ti < Tz$$

El porcentaje de crecimiento calculado para cada línea celular ensayada se proporciona en la tabla 2

35

Tabla 2

Línea celular	3'AdT-RYF	Porcentaje de crecimiento Tioguanina-RYF	5'AdT-RYF
<b>Leucemia</b>			
CCRF-CEM	53,45	43,90	98,70
HL-60(TB)	70,62	51,19	95,89
K-562	87,52	64,70	109,56
MOLT-4	45,40	23,05	98,54
RPMI-8226	81,35	68,08	104,25
SR	84,80	13,87	109,65
<b>Cáncer de pulmón no microcítico</b>			
A549/ATCC	82,45	92,64	102,66
HOP-62	102,03	79,43	114,67
HOP-92	98,25	94,99	99,83
NCI-H226	96,97	90,76	106,10
NCI-H23	98,27	104,79	115,75
NCI-H322M		120,25	118,09
NCI-H460	33,43	38,65	102,43
NCI-H522	110,62	102,59	119,23
<b>Cáncer de colon</b>			
COLO 205	108,84	114,86	111,19
HCC-2998	102,58	106,69	117,32
HCT-116	97,74	75,06	106,17
HCT-15	106,90	100,79	111,73

ES 2 718 181 T3

Línea celular	3'AdT-RYF	Porcentaje de crecimiento Tioguanina-RYF	5'AdT-RYF
HT29	100,38	83,18	98,93
KM12	105,07	97,68	107,42
SW-620	92,66	61,11	107,90
<b>Cáncer del SNC</b>			
SF-268	104,00	66,64	112,32
SF-295	105,74	79,05	106,60
SF-539	91,48	100,54	98,34
SNB-19	110,60	101,24	107,37
SNB-75	97,21	97,85	93,69
U251	86,13	83,47	102,81
<b>Melanoma</b>			
LOX IMVI	97,19	42,72	104,99
MALME-3M	94,33	84,12	130,94
M14	98,60	58,68	109,68
MDA-MB-435	85,83	79,84	100,66
SK-MEL-2	124,24	126,86	112,17
SK-MEL-28	107,37	105,71	105,50
SK-MEL-5	97,47	96,96	102,45
UACC-257	96,89	84,76	105,98
UACC-62	87,13	26,64	106,42
<b>Cáncer de ovario</b>			
IGROV1	126,74	95,59	111,16
OVCAR-3	118,06	103,06	113,03
OVCAR-4	103,44	88,49	92,35
OVCAR-5	122,59	109,15	107,73
OVCAR-8	87,74	67,03	102,70
NCI/ADR-RES	88,17	54,63	113,90
SK-OV-3	107,27	98,27	113,84
<b>Cáncer renal</b>			
786-0	106,78	94,97	112,19
A498	107,72	97,50	117,71
ACHN	60,47	45,46	100,75
RXF 393	96,63	91,71	97,28
SN12C	---	84,02	102,57
TK-10	108,34	111,91	110,77
UO-31	100,01	57,20	114,49
<b>Cáncer de próstata</b>			
PC-3	81,48	76,13	104,03
DU-145	90,48	64,98	107,78
<b>Cáncer de mama</b>			
MCF7	74,99	86,30	111,41
MDA-MB-231/ATCC	98,27	94,34	96,92
HS 578T	109,43	108,12	113,42
BT-549	103,38	91,09	122,81
T-47D	100,40	89,47	109,17
MDA-MB-468	99,93	98,01	104,66

También se calcularon tres parámetros de respuesta a la dosis para cada agente experimental (datos no mostrados). La inhibición de crecimiento del 50 % (IG50) se calculó a partir de  $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$ , que es la concentración



de fármaco que da como resultado una reducción del 50 % en el aumento neto de proteína (medido mediante tinción de SRB) en las células de control durante la incubación con fármaco. La concentración de fármaco que da como resultado una inhibición total de crecimiento (TGI) se calcula a partir de  $T_i = T_z$ . La CL50 (concentración de fármaco que da como resultado una reducción del 50 % en la proteína medida al final del tratamiento con fármaco en comparación con la inicial) que indica una pérdida neta de células después del tratamiento se calculó mediante  $[(T_i - T_z)/T_z] \times 100 = -50$ . Se calcularon los valores para cada uno de estos tres parámetros en caso de que se alcanzase el nivel de actividad; sin embargo, en caso de que no se alcanzase o se superase el efecto, el valor para ese parámetro se expresó como mayor o menor que la concentración máxima o mínima ensayada.

10 Tal como se observa en la tabla 2, el experimento evaluó dos compuestos activos (3'AdT y tioguanina) conjugados a un grupo RYF para formar un conjugado de BAM tal como se describe en el presente documento. Se evaluó la inhibición del crecimiento con conjugado de BAM en 60 líneas celulares tumorales (leucemias, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama). Como control negativo se incluyó un conjugado no activo (5'AdT, un análogo de nucleótido inactivo). Se usó el doble de la desviación estándar entre líneas celulares no de leucemia/linfoma como umbral arbitrario para detectar la inhibición del crecimiento (crecimiento menor del 85 % de las células no tratadas).

20 Como cabía esperar, el control negativo no inhibió el crecimiento celular: ninguna de las 60 líneas celulares creció por debajo del 85 % de las células no tratadas. Esto demuestra que los péptidos de acuerdo con la invención no tienen inhibición intrínseca del crecimiento en esta configuración experimental.

25 Se observó inhibición del crecimiento con ambos compuesto activos conjugados en 5 de las 6 líneas celulares de leucemia/linfoma (3'AdT: crecimiento medio del 71 % de las no tratadas; Tioguanina: 44,13 % de las no tratadas). Por el contrario, solo 3 de las 54 líneas celulares de otros linajes mostró inhibición del crecimiento por debajo del 85 % (3'AdT: crecimiento medio del 98,26 % de las no tratadas; Tioguanina: 86,65 % de las no tratadas). La diferencia en la inhibición del crecimiento entre las líneas celulares de leucemia de líneas celulares cancerosas de otros orígenes fue estadísticamente significativa tanto para 3'AdT ( $p = 0,010$ ) como para tioguanina ( $p = 0,003$ ), pero no para el control negativo, 5'AdT ( $p > 0,05$ ).

30 El perfil de respuesta de inhibición del crecimiento correspondió a la expresión esperada del gen CHST11 y C4S en células mieloides normales y tumorales y en células linfoides tumorales. En conclusión, los resultados demuestran que los péptidos de acuerdo con la invención tienen como diana selectiva células tumorales de los linajes mieloides y linfoides, que expresan el gen CHST11 y por lo tanto, C4S.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Phi Pharma SA  
<120> Moléculas transportadoras específicas para proteoglicano C4S

40 <130> U1413 PCT S3  
<150> EP 12191840.3  
<151> 08-11-2012

45 <150> US 61/723.872  
<151> 08-11-2012

50 <150> EP 13154867.9  
<151> 12-02-2013

<150> US 61/763.570  
<151> 12-02-2013

55 <160> 37

<170> BiSSAP 1.2

60 <210> 1  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

65 <220>

ES 2 718 181 T3

<221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Gln

5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His

10

<400> 1

Arg	Ser	Thr	Xaa	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Xaa
1				5					10

<210> 2  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

20

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Val

25

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His

30

<400> 2

Arg	Tyr	Phe	Xaa	Arg	Ile	Lys	Tyr	Arg	Xaa
1				5					10

35

<210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

45

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Val

50

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His

55

<400> 3

Arg	Tyr	Phe	Xaa	Arg	Ile	Lys	Ala	Arg	Xaa
1				5					10

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT

60

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Val  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
 15  
 <400> 4  
  

Arg	Ala	Ala	Xaa	Arg	Ala	Lys	Tyr	Arg	Xaa
1				5					10

  
 20  
 <210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 30  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Val  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 35  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
  
 <400> 5  
  

Arg	Ala	Ala	Xaa	Arg	Ile	Lys	Tyr	Arg	Xaa
1				5					10

  
 40  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Gln  
 50  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
 55  
  
 <400> 6  
 60

ES 2 718 181 T3

Arg Ser Thr Xaa Arg Tyr Arg Val Arg Xaa  
1 5 10

5 <210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Gln

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 10  
<223> Xaa en la posición 10 es D-His

<400> 7

Arg Ser Thr Xaa Arg Tyr Lys Val Arg Xaa  
1 5 10

25 <210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

35 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Gln

40 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 10  
<223> Xaa en la posición 10 es D-His

<400> 8

Arg Gly Gly Xaa Arg Gly Lys Gly Arg Xaa  
1 5 10

45 <210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

55 <220>  
<221> VAR\_SEQ  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-His

ES 2 718 181 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
 5 <400> 9  
  

Arg	His	His	Xaa	Arg	His	Lys	His	Arg	Xaa
1				5					10

  
 10 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 20 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Val  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 25 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
  
 <400> 10  
  

Arg	Val	Val	Xaa	Arg	Val	Lys	Val	Arg	Xaa
1				5					10

  
 30  
  
 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S  
  
 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Leu  
  
 45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
  
 50 <400> 11  
  

Arg	Leu	Leu	Xaa	Arg	Leu	Lys	Leu	Arg	Xaa
1				5					10

  
  
 55 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S  
 60

ES 2 718 181 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Met  
 5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His  
 10

**Arg Met Met Xaa Arg Met Lys Met Arg Xaa**  
**1 5 10**

15 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Ile

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His

<400> 13

**Arg Ile Ile Xaa Arg Ile Lys Ile Arg Xaa**  
**1 5 10**

35 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

45 <400> 14

**Arg Tyr Phe Val Arg Ile Lys Tyr Arg**  
**1 5**

50 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4

ES 2 718 181 T3

<223> Xaa en la posición 4 es D-Val

<400> 15

Arg Tyr Phe Xaa Arg Ile Lys Tyr Arg  
1 5

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido artificial de unión a C4S

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> 6

<223> Xaa en la posición 6 es D-Ile

20

<400> 16

Arg Tyr Phe Val Arg Xaa Lys Tyr Arg  
1 5

25

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

35 <223> Xaa en la posición 2 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

40 <223> Xaa en la posición 3 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea L-Lys o L-Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> 4

45 <223> Xaa en la posición 4 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> 6

50 <223> Xaa en la posición 6 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> 7

55 <223> Xaa en la posición 7 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea L-Lys o L-Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8

60 <223> Xaa en la posición 8 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg

# ES 2 718 181 T3

- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 representa de 0 a 10 aminoácidos, cada uno independientemente cualquier L o D-aminoácido distinto de D-Arg, D-Lys, L-Arg o L-Lys
- 5
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 11  
 <223> Xaa en la posición 11 representa de 0 a 1 aminoácido, que puede ser cualquier D-aminoácido distinto de D-Arg o D-Lys
- 10
- <400> 17
- |  |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|  | <b>Arg</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Arg</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Arg</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> |
|  | 1          |            |            |            | 5          |            |            |            |            | 10         |            |
- 15
- <210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 20
- <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S
- 25
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa en la posición 1 representa de 0 a 1 aminoácido, que puede ser cualquier D-aminoácido distinto de D-Arg o D-Lys
- 30
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa en la posición 2 representa de 0 a 10 aminoácidos, cada uno independientemente cualquier L o D-aminoácido distinto de D-Arg, D-Lys, L-Arg o L-Lys
- 35
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 40
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa en la posición 5 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 5 o Xaa en la posición 9, pero no ambos, sea L-Lys o L-Arg
- 45
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa en la posición 6 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 50
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa en la posición 8 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 55
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa en la posición 9 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 5 o Xaa en la posición 9, pero no ambos, sea L-Lys o L-Arg
- 60
- <220>



ES 2 718 181 T3

- <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 5 <400> 18
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Arg | Xaa | Xaa | Xaa | Arg | Xaa | Xaa | Xaa | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |
- 10 <210> 19  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S
- 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa en la posición 2 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa en la posición 3 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea D-Lys o D-Arg
- 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa en la posición 6 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa en la posición 7 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea D-Lys o D-Arg
- 45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa en la posición 8 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 representa de 0 a 10 aminoácidos, cada uno independientemente cualquier L o D-aminoácido distinto de D-Arg, D-Lys, L-Arg o L-Lys
- 55 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 11  
 <223> Xaa en la posición 11 representa de 0 a 1 aminoácido, que puede ser cualquier D-aminoácido distinto de D-Arg o D-Lys
- 60 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa en la posición 1 es D-Arg

- 5 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 5  
<223> Xaa en la posición 5 es D-Arg
- 10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 9  
<223> Xaa en la posición 9 es D-Arg
- <400> 19
- Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
**1 5 10**
- 15 <210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S
- 25 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 1  
<223> Xaa en la posición 1 representa de 0 a 1 aminoácido, que puede ser cualquier D-aminoácido distinto de D-Arg o D-Lys
- 30 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 2  
<223> Xaa en la posición 2 representa de 0 a 10 aminoácidos, cada uno independientemente cualquier L o D-aminoácido distinto de D-Arg, D-Lys, L-Arg o L-Lys
- 35 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 40 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 5  
<223> Xaa en la posición 5 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 5 o Xaa en la posición 9, pero no ambos, sea D-Lys o D-Arg
- 45 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 6  
<223> Xaa en la posición 6 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 50 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 8  
<223> Xaa en la posición 8 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 55 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 9  
<223> Xaa en la posición 9 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 5 o Xaa en la posición 9, pero no ambos, sea D-Lys o D-Arg
- 60 <220>  
<221> VARIANTE

# ES 2 718 181 T3

- <222> 10  
<223> Xaa en la posición 10 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 5 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 3  
<223> Xaa en la posición 3 es D-Arg
- 10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 7  
<223> Xaa en la posición 7 es D-Arg
- 15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 11  
<223> Xaa en la posición 11 es D-Arg
- 20 <400> 20
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |
- 25 <210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Grupo de direccionamiento consenso de las secuencias 17 y 18
- 35 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 2  
<223> Xaa en la posición 2 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 40 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 3  
<223> Xaa en la posición 3 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea L-Lys o L-Arg
- 45 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 50 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 6  
<223> Xaa en la posición 6 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 55 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 7  
<223> Xaa en la posición 7 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea L-Lys o L-Arg
- 60 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 8  
<223> Xaa en la posición 8 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- <400> 21

ES 2 718 181 T3

**Arg Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Arg**  
**1 5**

- 5 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> Grupo de direccionamiento consenso de las secuencias 19 y 20
- 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa en la posición 2 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa en la posición 3 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea D-Lys o D-Arg
- 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa en la posición 6 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa en la posición 7 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg, a condición de que Xaa en la posición 3 o Xaa en la posición 7, pero no ambos, sea D-Lys o D-Arg
- 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa en la posición 8 es cualquier L o D-aminoácido distinto de L-Lys, D-Lys, L-Arg o D-Arg
- 45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa en la posición 1 es D-Arg
- 50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa en la posición 5 es D-Arg
- 55 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa en la posición 9 es D-Arg
- <400> 22

**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 23

ES 2 718 181 T3

<211> 5  
 <212> **PRT**  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Enlazador artificial

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Gly  
 1 5

10

<210> 24  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Enlazador artificial

20

<400> 24

Gly Gly Gly Gly  
 1

25

<210> 25  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

35

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa en la posición 6 es D-Ile

40

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa en la posición 10 es D-His

<400> 25

Arg Tyr Phe Val Arg Xaa Lys Tyr Arg Xaa  
 1 5 10

45

<210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

55

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Gln

<400> 26

ES 2 718 181 T3

Arg Ser Thr Xaa Arg Tyr Arg Val Arg  
1 5

5 <210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Val  
15 <400> 27

Arg Tyr Phe Xaa Arg Ile Lys Ala Arg  
1 5

20 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
<221> VARIANTE  
30 <222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Val  
<400> 28

Arg Ala Ala Xaa Arg Ala Lys Tyr Arg  
1 5

35 <210> 29  
<211> 9  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Val  
45 <400> 29  
50

Arg Ala Ala Xaa Arg Ile Lys Tyr Arg  
1 5

55 <210> 30  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 718 181 T3

<220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Gln

10 <400> 30

**Arg Ser Thr Xaa Arg Tyr Arg Val Arg**

1 5

15 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Gln

<400> 31

**Arg Ser Thr Xaa Arg Tyr Lys Val Arg**

1 5

30 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-Gly

<400> 32

**Arg Gly Gly Xaa Arg Gly Lys Gly Arg**

1 5

45 <210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido artificial de unión a C4S

55 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa en la posición 4 es D-His

ES 2 718 181 T3

<400> 33

Arg His His Xaa Arg His Lys His Arg  
1 5

5 <210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
15 <221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Val

<400> 34

Arg Val Val Xaa Arg Val Lys Val Arg  
1 5

20 <210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
30 <221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Leu

<400> 35

Arg Leu Leu Xaa Arg Leu Lys Leu Arg  
1 5

40 <210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Péptido artificial de unión a C4S

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
<223> Xaa en la posición 4 es D-Met

<400> 36

Arg Met Met Xaa Arg Met Lys Met Arg  
1 5

55 <210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial



ES 2 718 181 T3

<220>

<223> Péptido artificial de unión a C4S

5 <220>  
<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa en la posición 4 es D-Ile

10 <400> 37

Arg Ile Ile Xaa Arg Ile Lys Ile Arg  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula o compuesto que comprende o consiste en una de las siguientes estructuras consenso (I) a (IV):

- 5 (I) Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (II) Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
 (III) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>; o  
 (IV) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>;
- 10 (a) en donde, LD<sub>10</sub> o LD<sub>1</sub> representan cualquier L o D-aminoácido distinto de D-arginina, D-lisina; L-arginina o L-lisina y n tiene un valor de 0 a 10;  
 (b) en donde XD<sub>11</sub> o XD<sub>2</sub> representan cualquier D-aminoácido distinto de D-arginina o D-lisina y m tiene un valor de 0 o 1;  
 (c) en donde Arg<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>, y Arg<sub>9</sub> representan L-arginina; y X representa L-lisina o L-arginina;
- 15 (d) en donde (SP<sub>A</sub>) consiste en una cadena peptídica de 3 restos aminoacídicos, en donde cada resto se selecciona independientemente entre cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina;  
 (e) en donde (SP<sub>C</sub>) consiste en un solo resto aminoacídico que es cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina, D-lisina, L-arginina o L-lisina; y
- 20 (f) en donde (SP<sub>B</sub>) consiste en un solo resto de D-aminoácido que es cualquier resto aminoacídico distinto de D-arginina o D-lisina.

2. La molécula o el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en conjunto contienen no más de 3 restos de alanina.

25 3. La molécula o el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en conjunto no contienen restos de prolina.

30 4. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) y (SP<sub>C</sub>) en conjunto incluyen uno o más aminoácidos seleccionados entre Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile y Leu.

5. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde LD<sub>10</sub> representa L o D-histidina.

35 6. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde XD<sub>11</sub> representa D-histidina.

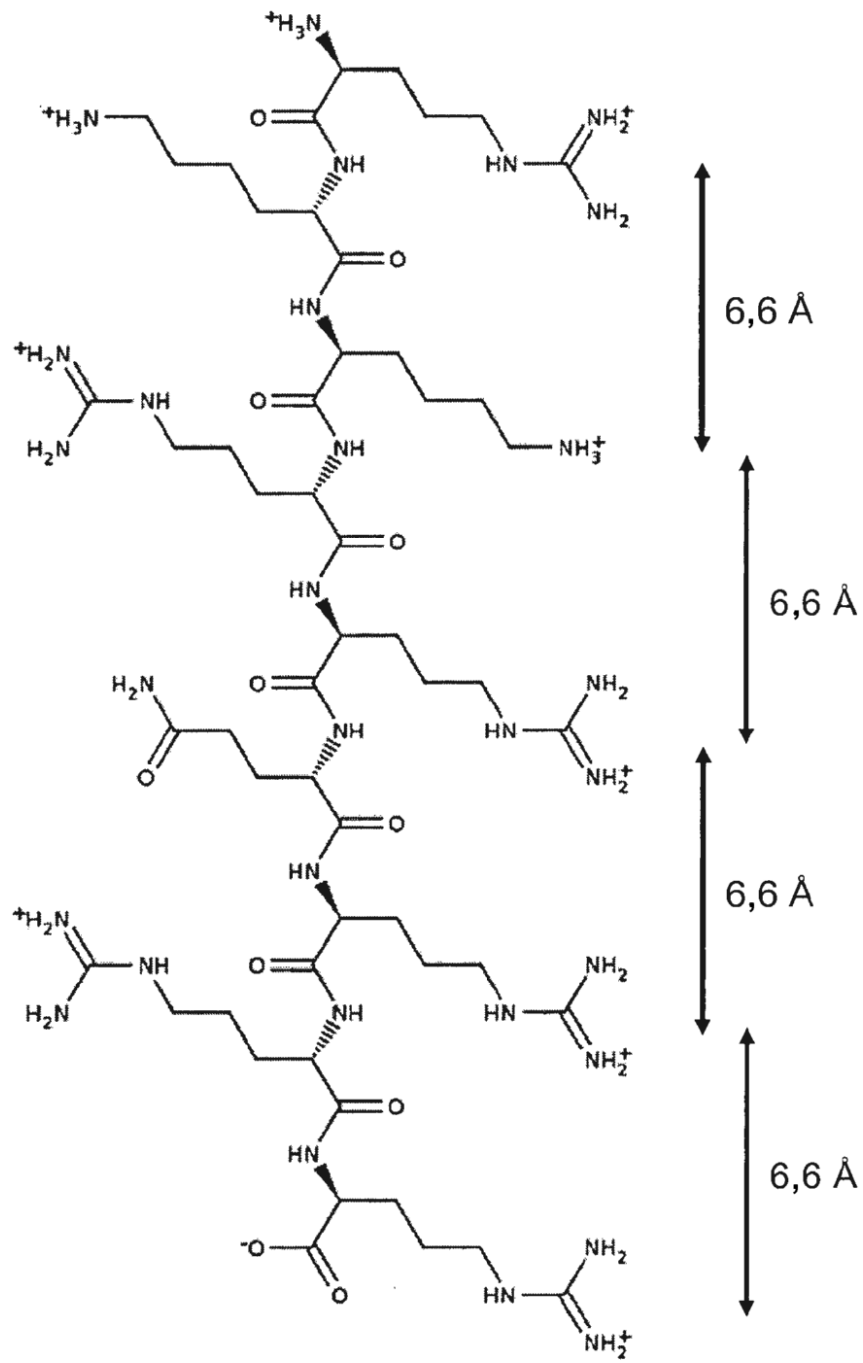
7. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde m tiene un valor de 1.

40 8. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde n tiene un valor de 0.

9. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que tiene la secuencia

- 45 RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 1);  
 RYFvRIKYRh (SEQ ID NO: 2);  
 RYFvRIKARh (SEQ ID NO: 3);  
 RAAvRAKYRh (SEQ ID NO: 4);  
 50 RAAvRIKYRh (SEQ ID NO: 5);  
 RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 6);  
 RSTqRYKVRh (SEQ ID NO: 7);  
 RGGgRGKGRh (SEQ ID NO: 8);  
 RHHhRHKHRh (SEQ ID NO: 9);  
 55 RVVvRVKVRh (SEQ ID NO: 10);  
 RLL1RLKLRh (SEQ ID NO: 11);  
 RMMmRMKMRh (SEQ ID NO: 12);  
 RIIiRIKIRh (SEQ ID NO: 13);  
 RYFVriKYRh (SEQ ID NO: 25);  
 60 RSTqRYRVR (SEQ ID NO: 26);  
 RYFvRIKYR (SEQ ID NO: 15);  
 RYFvRIKAR (SEQ ID NO: 27);  
 RAAvRAKYR (SEQ ID NO: 28);  
 RAAvRIKYR (SEQ ID NO: 29);  
 65 RSTqRYRVR (SEQ ID NO: 30);  
 RSTqRYKVR (SEQ ID NO: 31);

- |   |           |                    |
|---|-----------|--------------------|
|   | RGGgRGKGR | (SEQ ID NO: 32);   |
|   | RHHhRHKHR | (SEQ ID NO: 33);   |
|   | RVVvRVKVR | (SEQ ID NO: 34);   |
|   | RLL1RLKLR | (SEQ ID NO: 35);   |
| 5 | RMMmRMKMR | (SEQ ID NO: 36);   |
|   | RIIiRIKIR | (SEQ ID NO: 37); o |
|   | RYFVRiKYR | (SEQ ID NO: 16).   |
10. Un conjugado que comprende la molécula o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 conjugado a un grupo biológicamente activo (BAM).
11. El conjugado de la reivindicación 10, en donde dicho BAM está conjugado al extremo de dicha estructura consenso de acuerdo con una de las siguientes estructuras consenso:
- 15 (VII) (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
(VIII) (BAM)-(ENLACE)-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(LD<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-(XD<sub>11</sub>)<sub>m</sub>;  
(IX) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>B</sub>)-X-(SP<sub>C</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM); o  
(X) (XD<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(LD<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Arg<sub>1</sub>-(SP<sub>C</sub>)-X-(SP<sub>B</sub>)-Arg<sub>5</sub>-(SP<sub>A</sub>)-Arg<sub>9</sub>-(ENLACE)-(BAM)
- 20 (a) en donde (BAM) representa un grupo biológicamente activo; y  
(b) en donde (ENLACE) representa un grupo enlazador opcional.
12. El conjugado de la reivindicación 11, en donde el grupo enlazador (ENLACE) es L o D-Glu.
- 25 13. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde dicho BAM está conjugado a Arg<sub>1</sub> o Arg<sub>9</sub> mediante un enlace covalente amida N-terminal o éster C-terminal.
14. El conjugado de la reivindicación 10, en donde dicho BAM está conjugado a un resto aminoacídico dentro de (SP<sub>A</sub>), (SP<sub>B</sub>) o (SP<sub>C</sub>).
- 30 15. El conjugado de la reivindicación 14, en donde dicha conjugación es o bien conjugación directa a un resto interno de dicha secuencia peptídica o indirecta mediante un grupo enlazador.
- 35 16. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en donde el BAM es un mono o polisacárido, un agente citotóxico, un agente antineoplásico, un agente antiinflamatorio, un agente antivírico, un agente antibacteriano o un agente para el tratamiento de infecciones por protozoos.
17. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde el BAM es desoxirribosa o ribosa.
- 40 18. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17.
19. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17 para uso como medicamento.
- 45 20. Uso *in vitro* de la molécula o compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para facilitar el transporte de una molécula biológicamente activa al interior de células mieloides.
21. La molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para facilitar el transporte de una molécula biológicamente activa al interior de células mieloides.
- 50 22. Uso de la molécula o el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de un conjugado fármaco-peptido.



TAT

FIG. 1 (Izquierda)

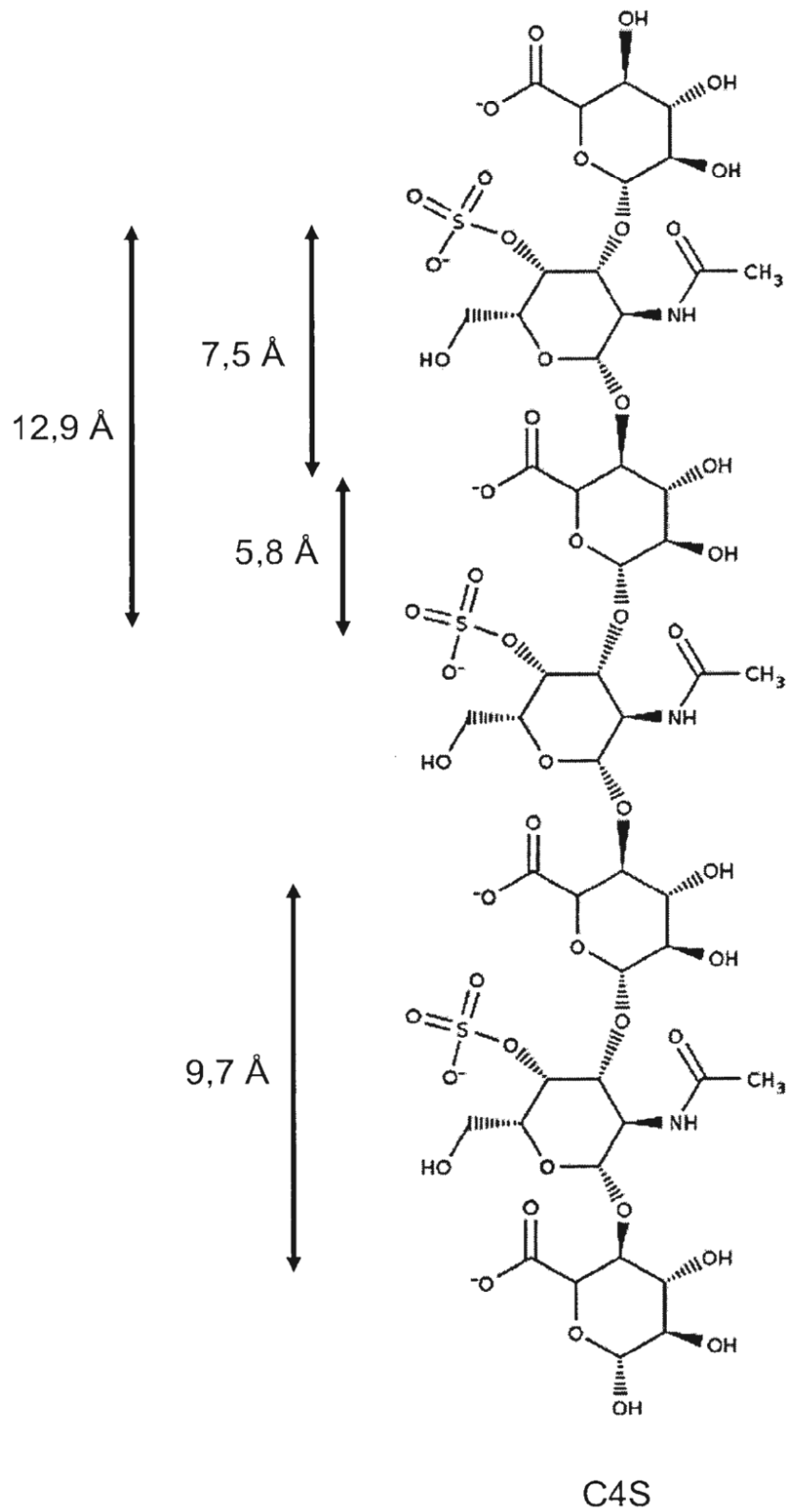


FIG. 1 (Derecha)

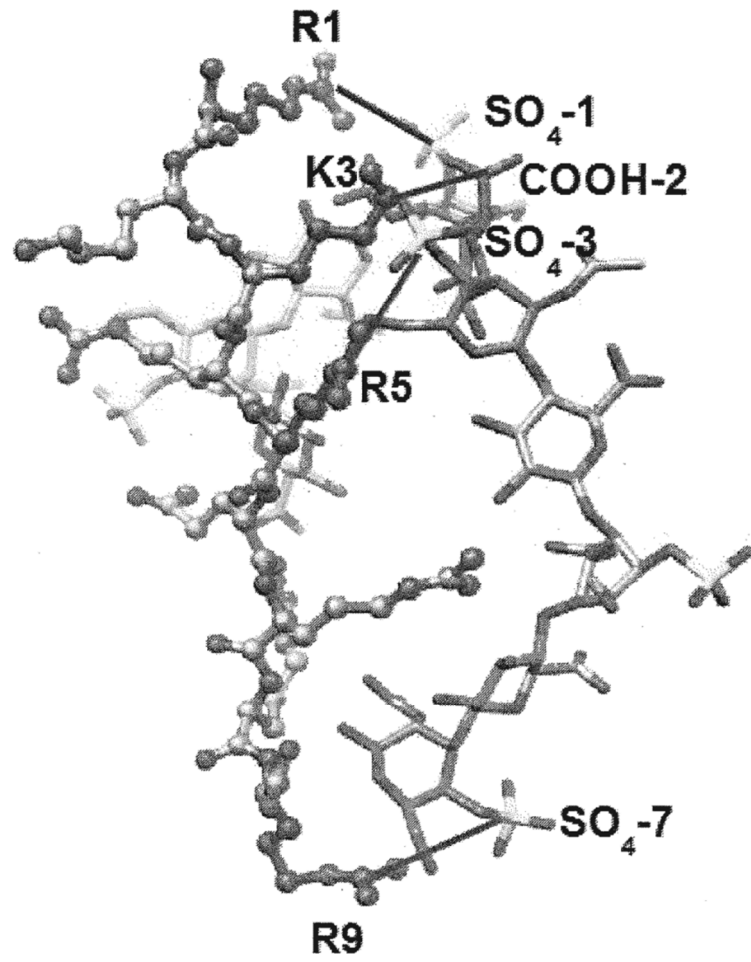


FIG. 2

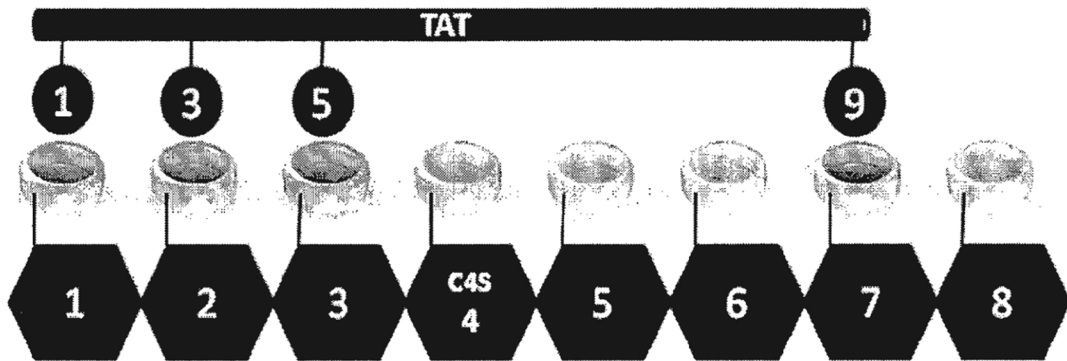


FIG. 3

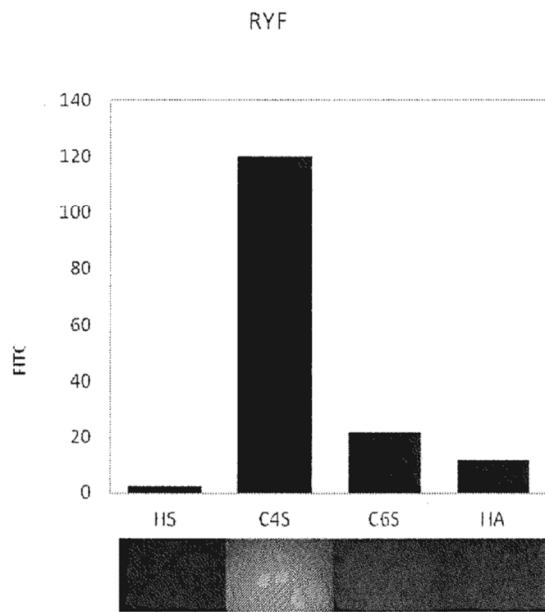


FIG. 4A

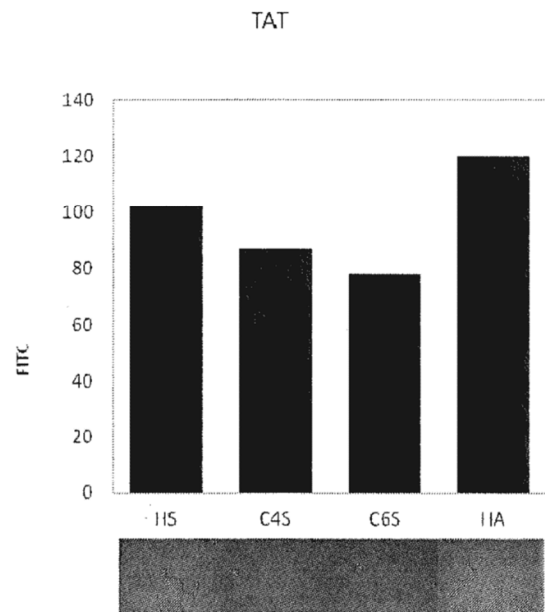


FIG. 4B



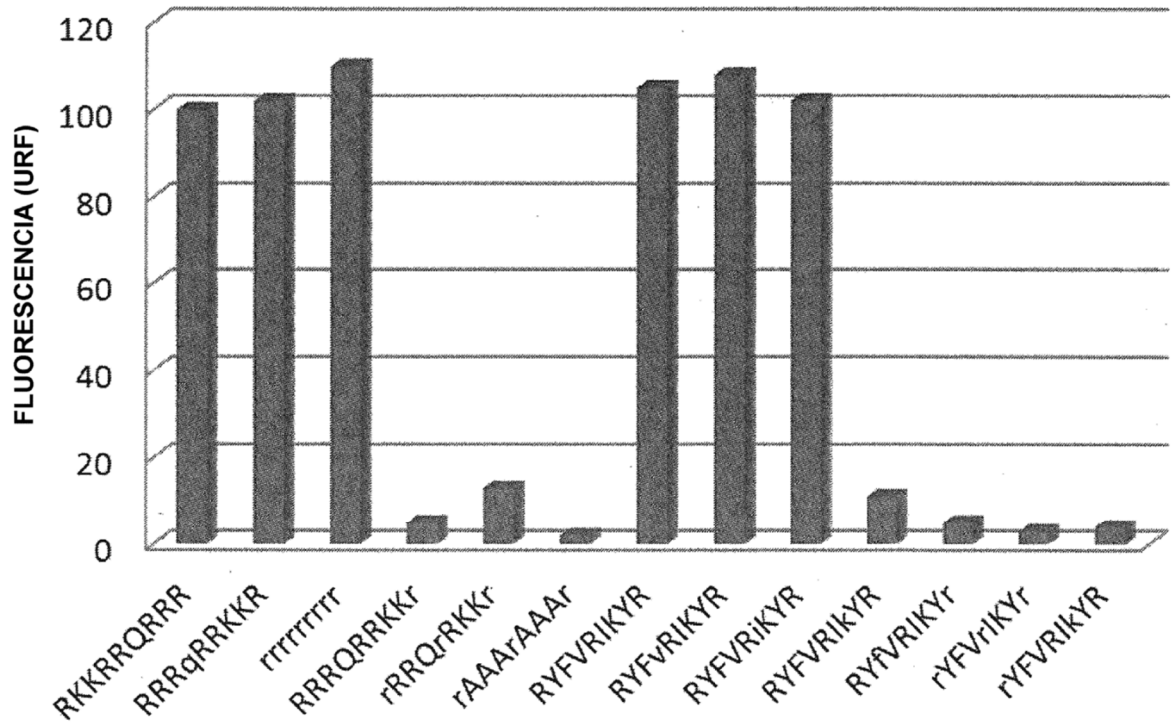


FIG. 5

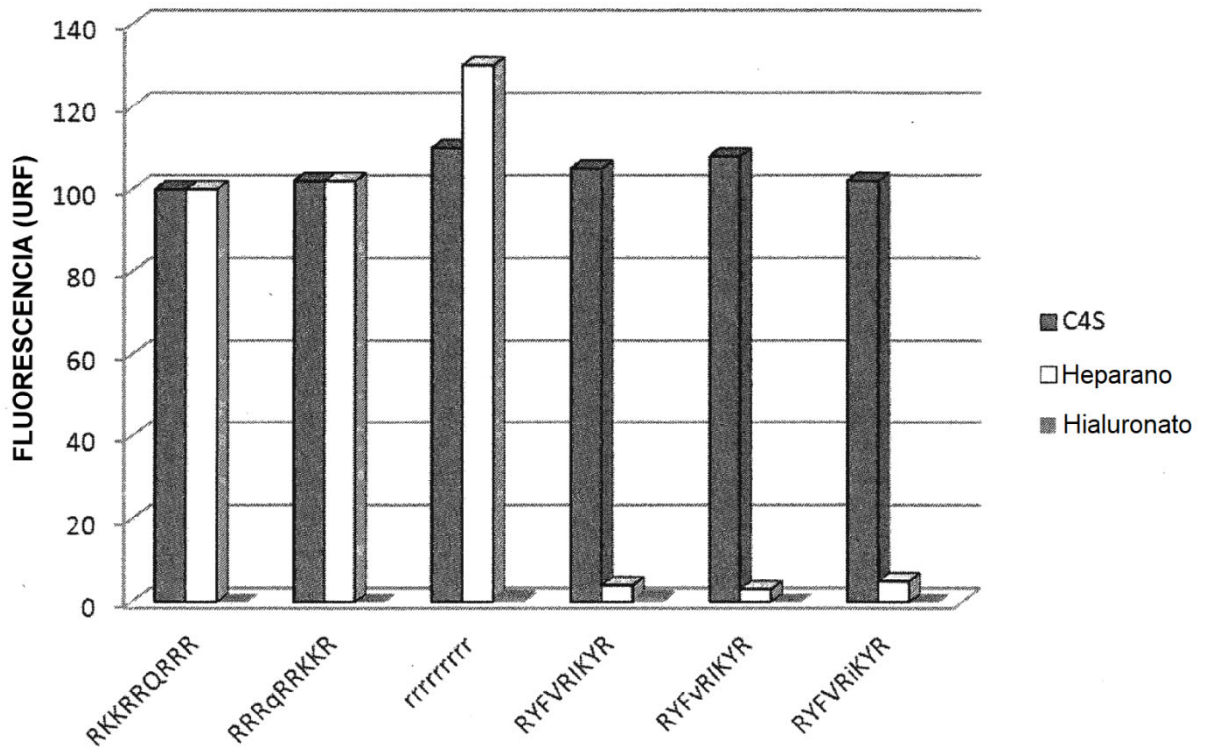


FIG. 6

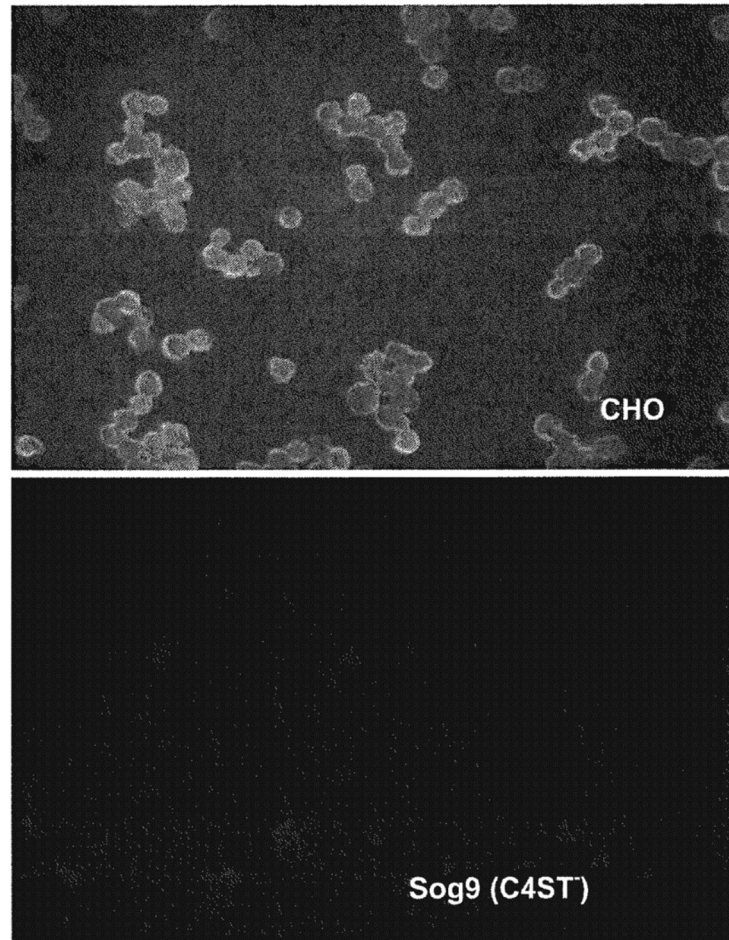


FIG. 7

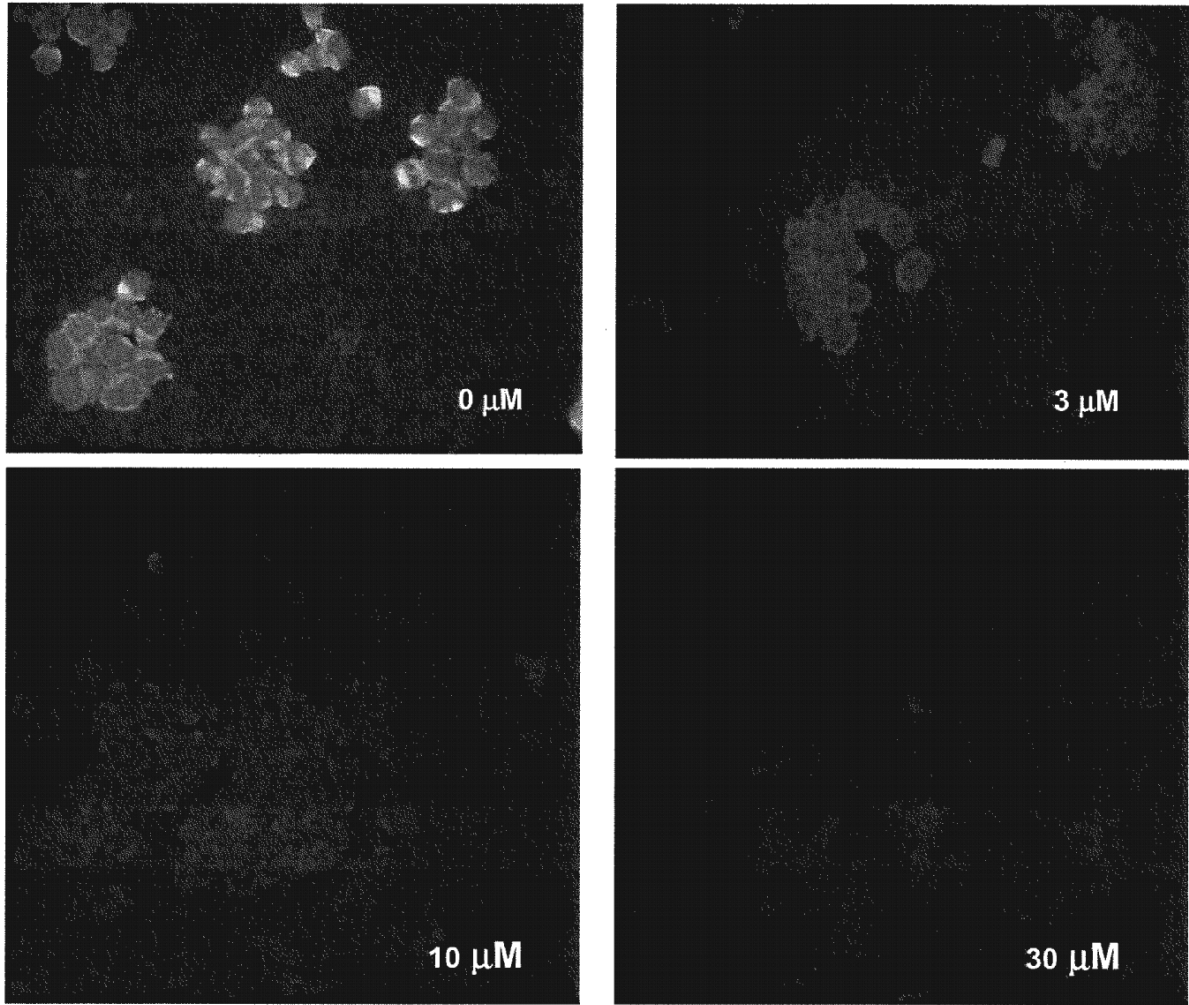


FIG. 8

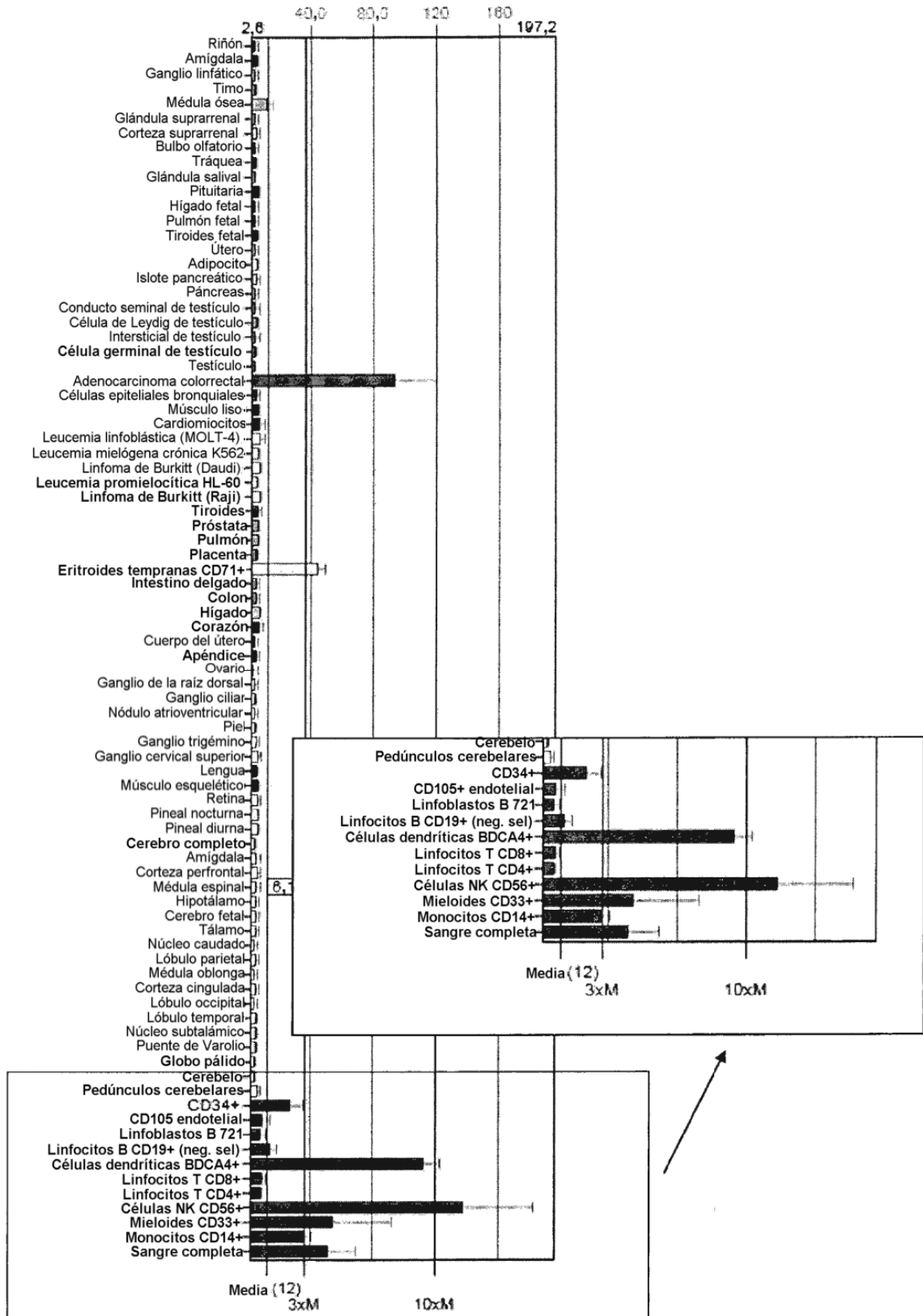


FIG. 9

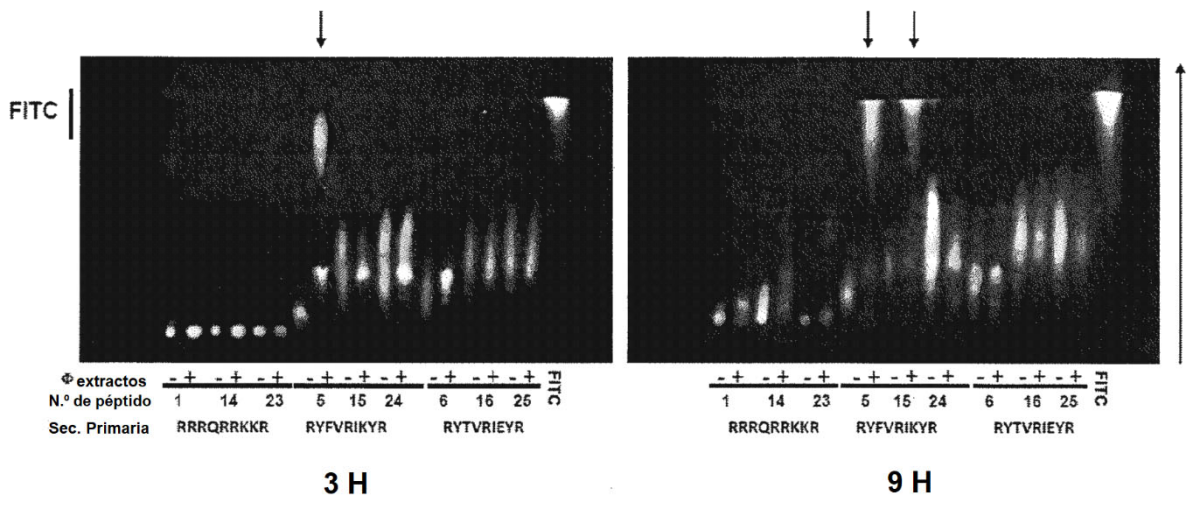


FIG. 10

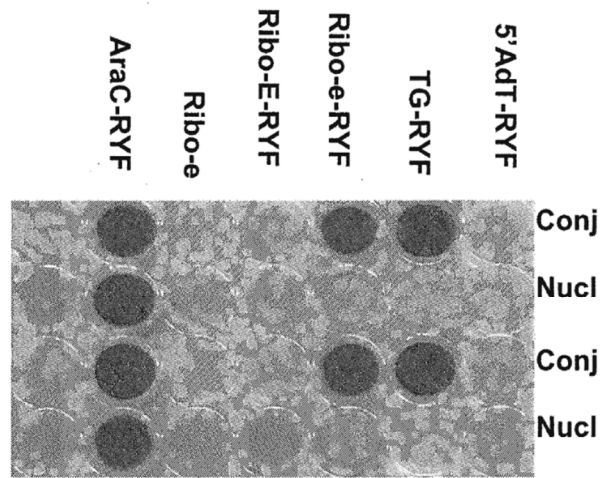


FIG. 11A

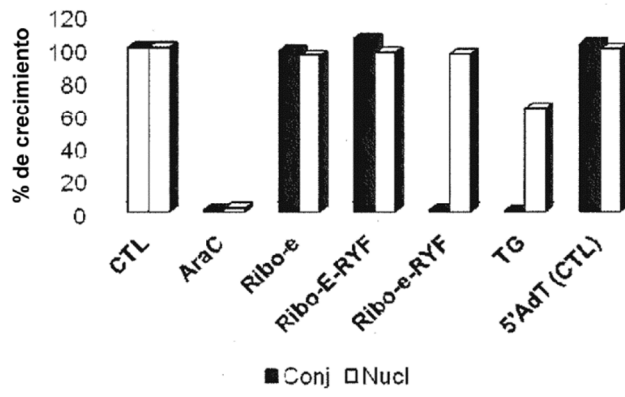


FIG. 11B

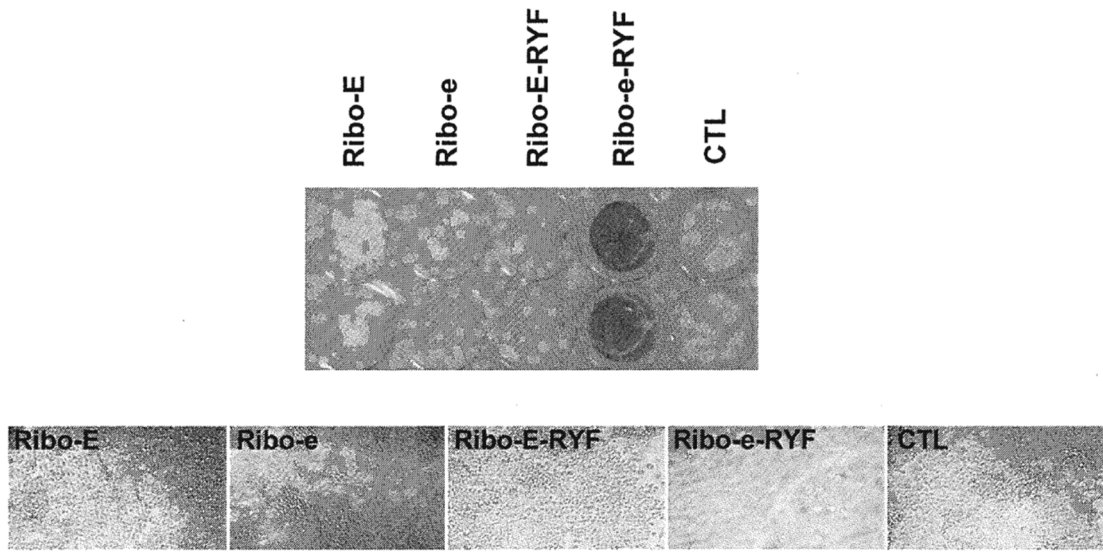


FIG. 12



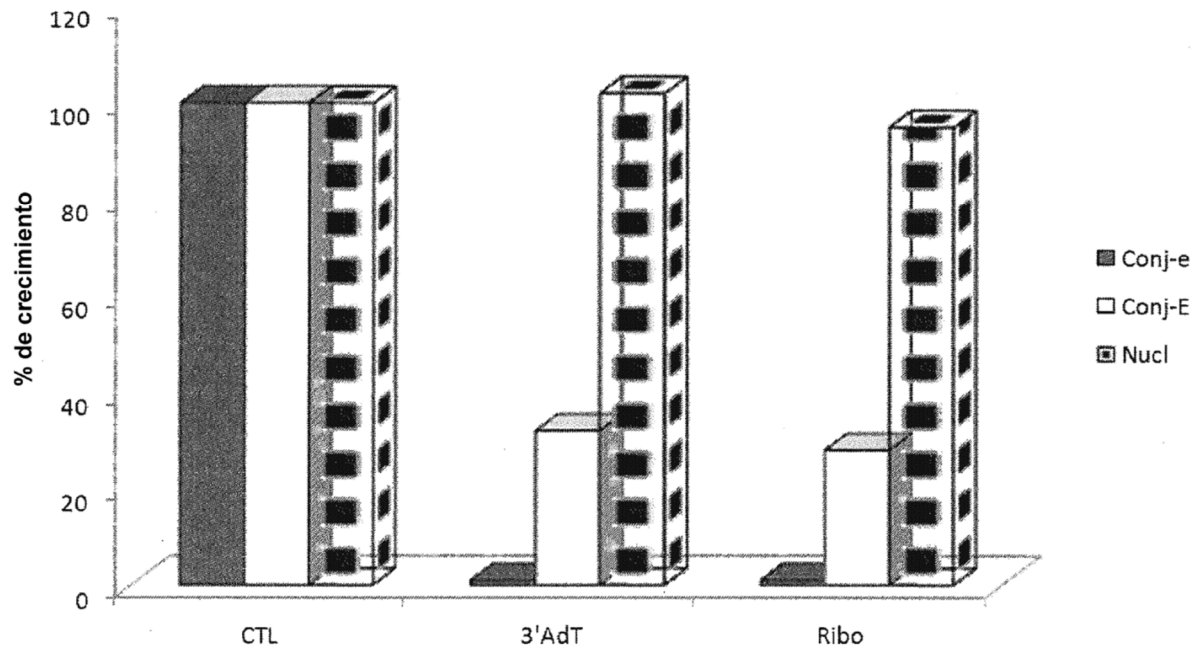


FIG. 13

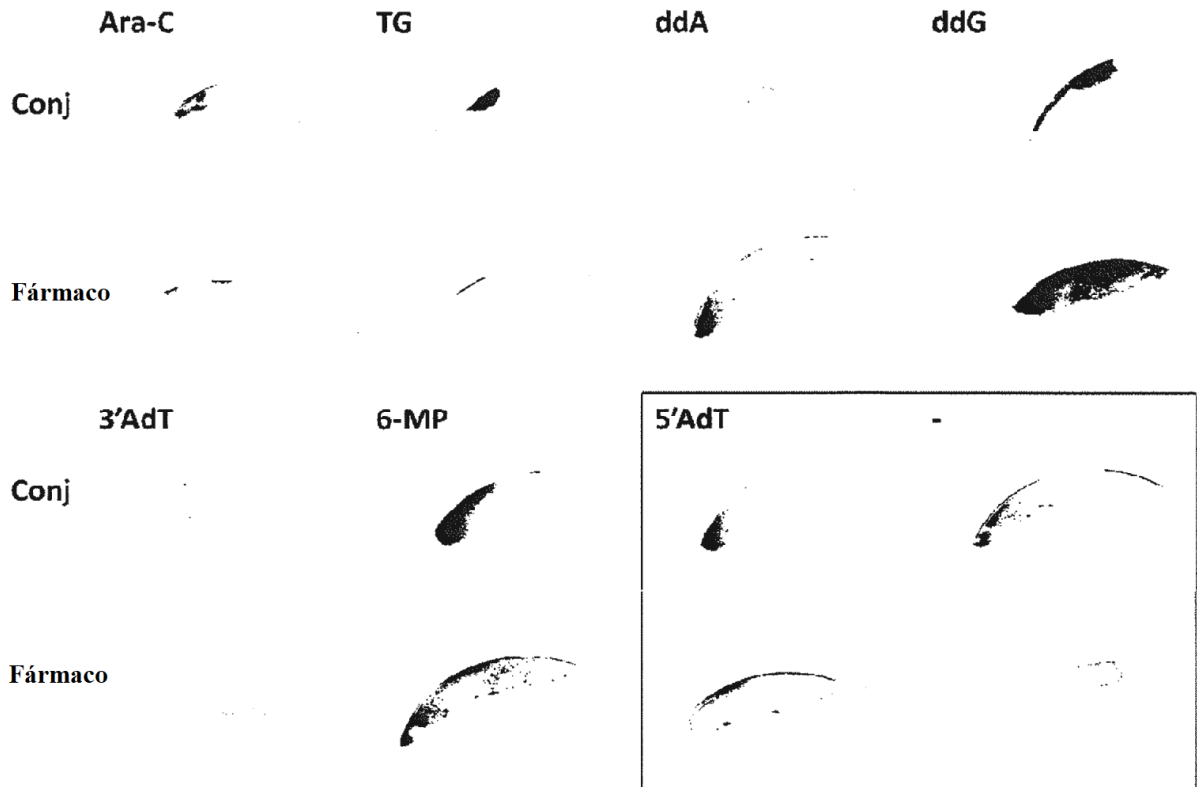


FIG. 14

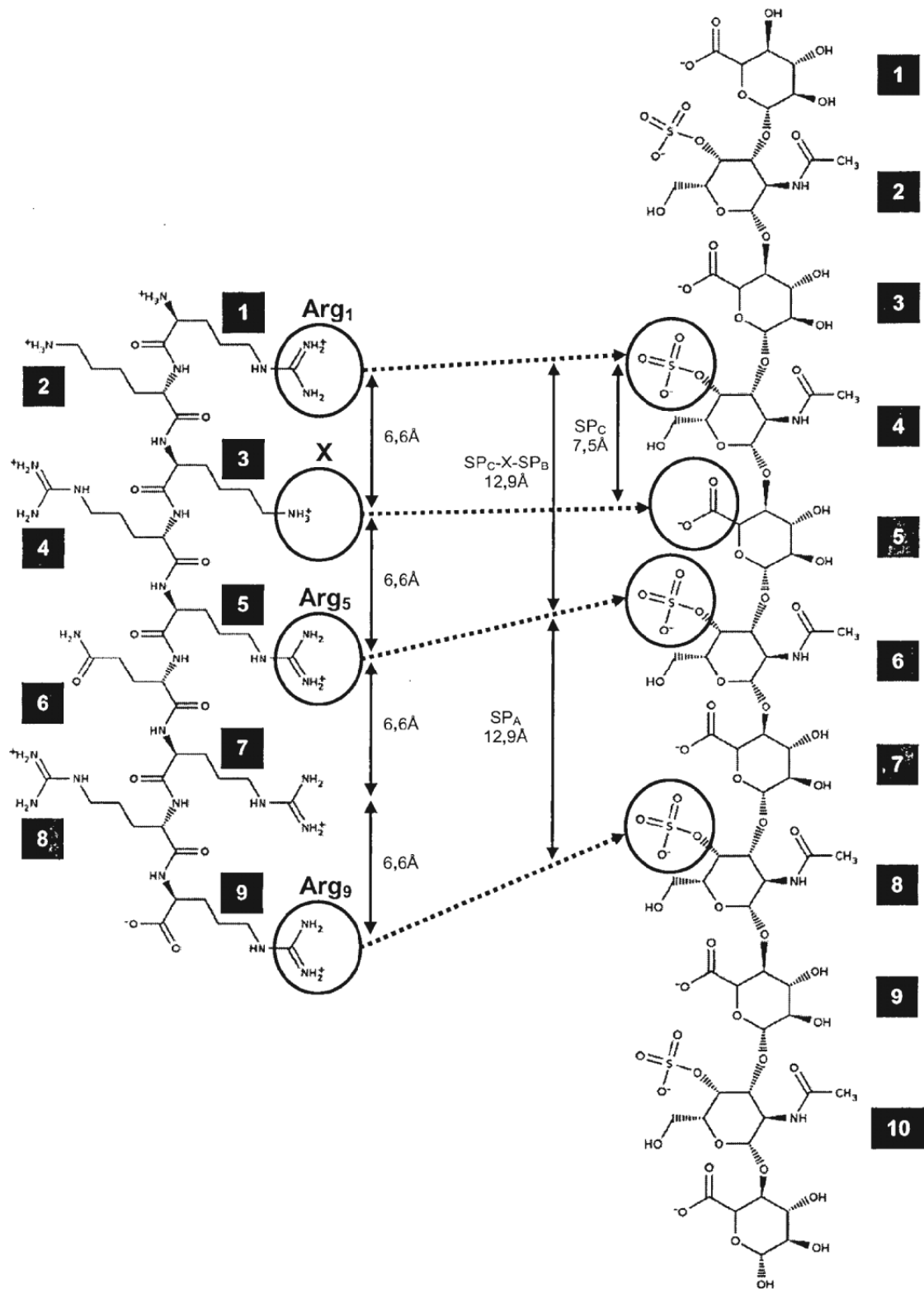


FIG. 15

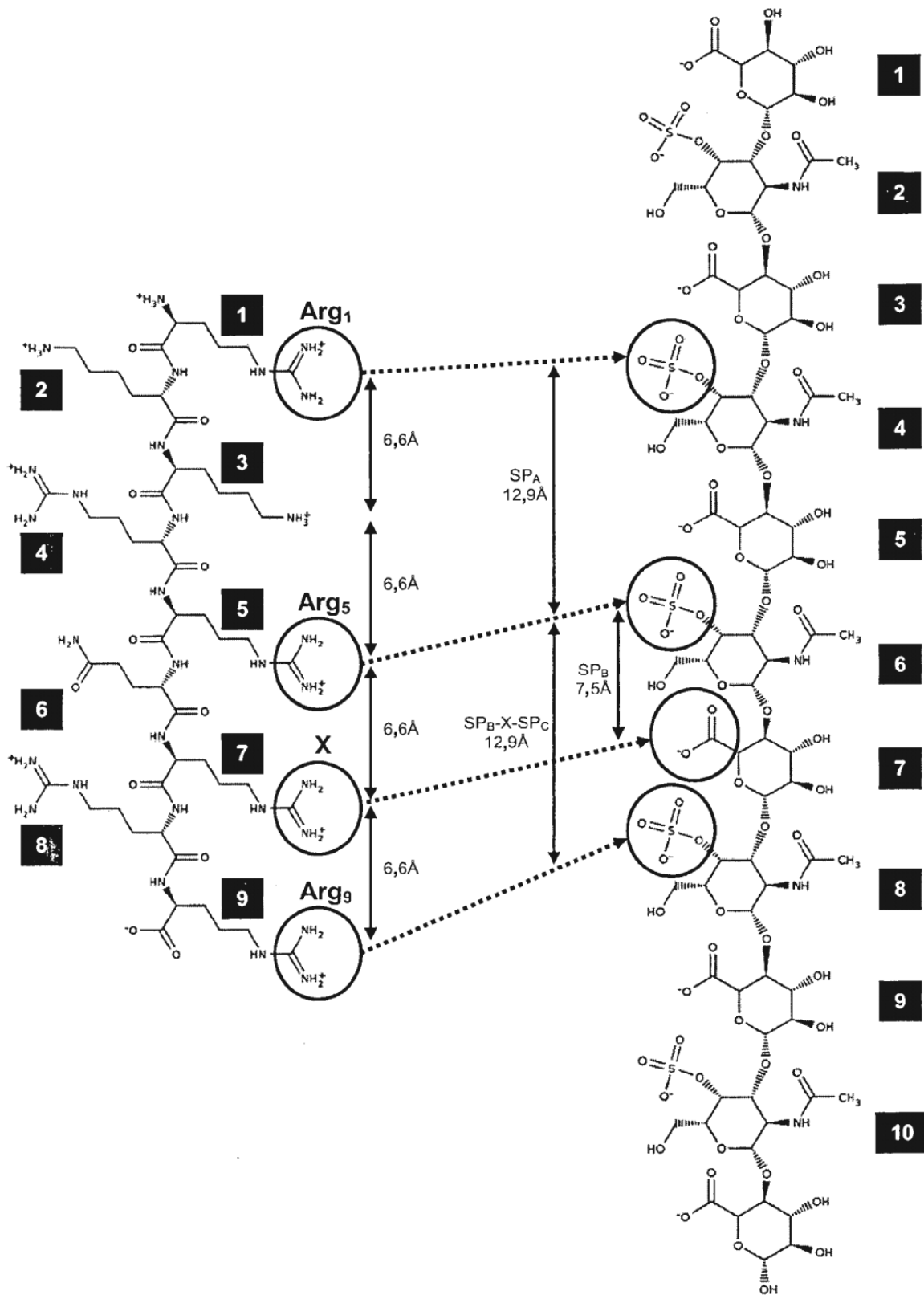


FIG. 16

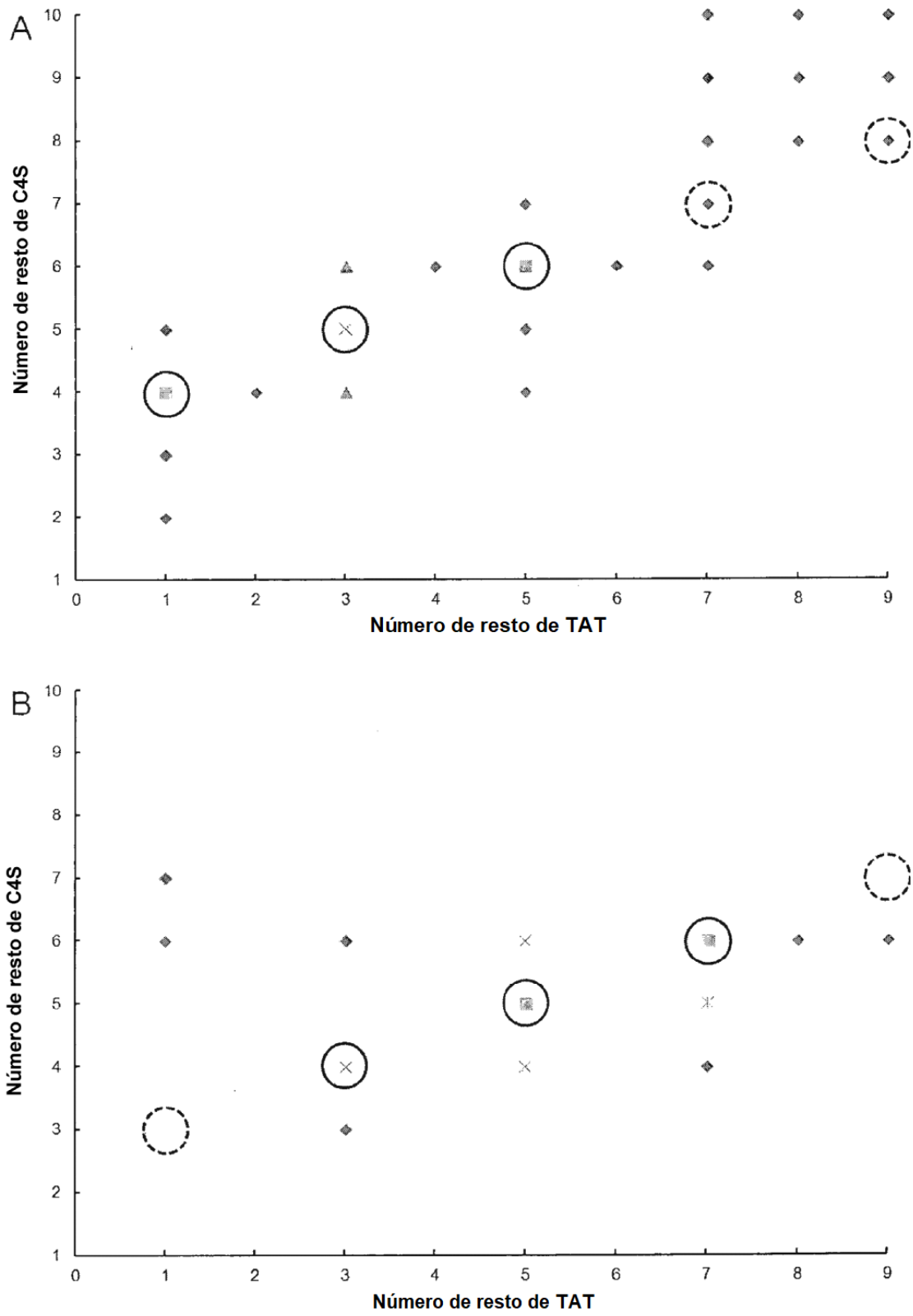


FIG. 17

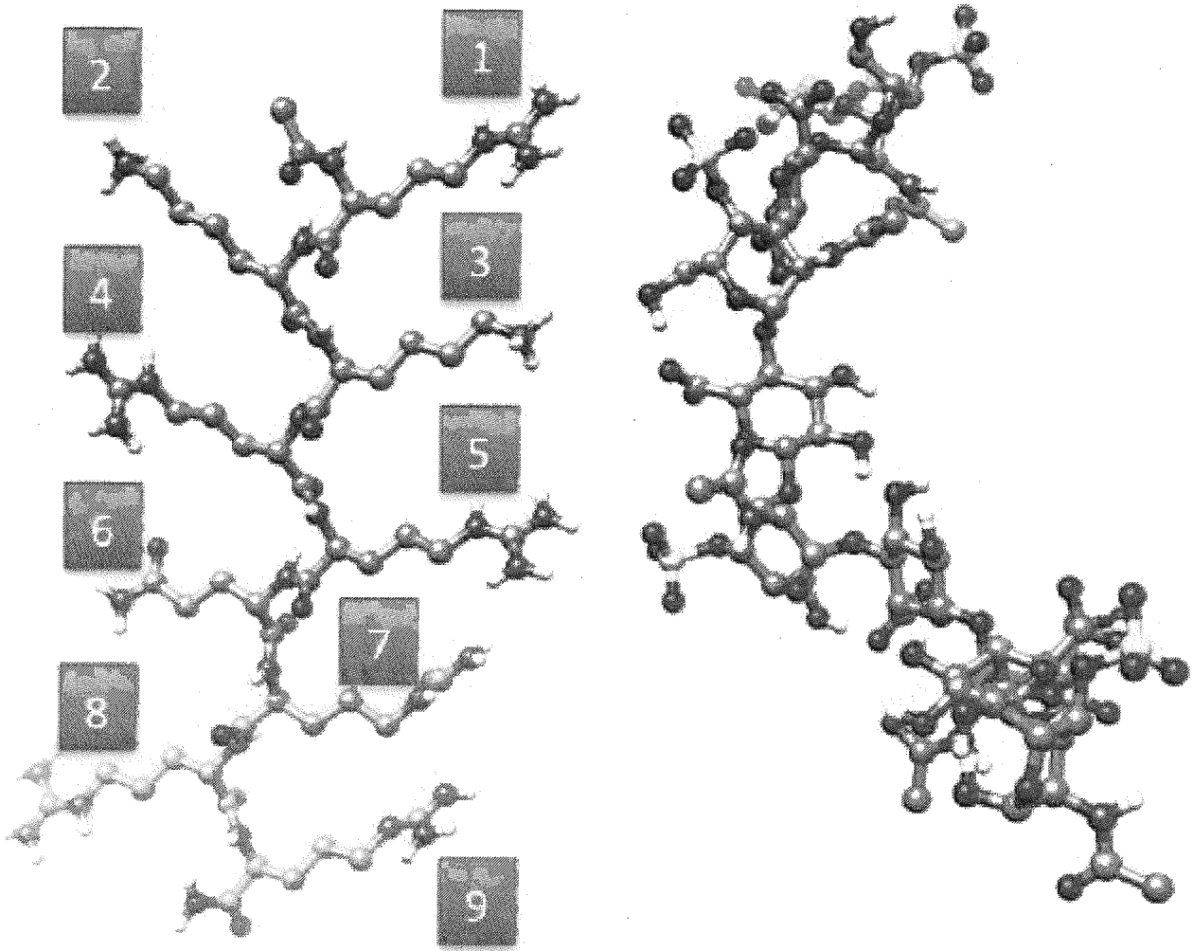


FIG. 18A

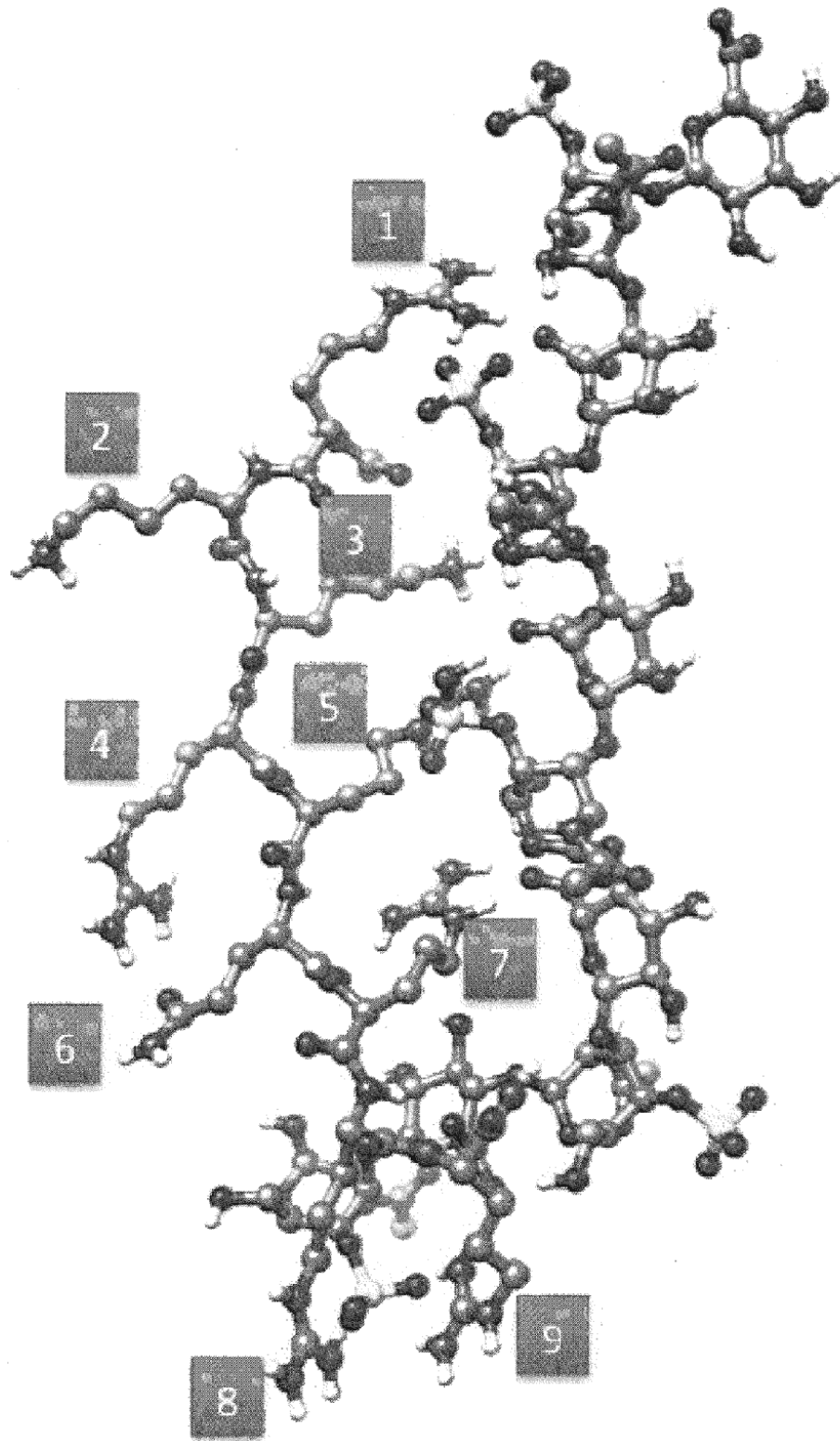


FIG. 18B

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

10

- WO 2010072406 A [0005]
- WO 2010072228 A [0005] [0146]
- WO 2010072275 A [0005]
- EP 12191840 A [0168]
- US 61723872 B [0168]
- EP 13154867 A [0168]
- US 61763570 B [0168]

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **SEEBACH et al.** *Chem. Biodivers.*, 2004, vol. 1, 1111-1239 [0066]
- **CHAKRABORTY et al.** *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2002, vol. 5, 373-387 [0066]
- **ROBINSON.** *Acc. Chem. Res.*, 2008, vol. 41, 1278-1288 [0066]
- **HERSHBERGER et al.** *Curr. Top. Med. Chem.*, 2007, vol. 7, 928-924 [0066]
- **JAGADISH ; CAMARERO.** *Biopolymers*, 2010, vol. 94, 611-616 [0066]
- **ROSE et al.** *JACS*, 1994, vol. 116, 30 [0070]
- **MEANS ; FEENEY.** *Chemical Modification of Proteins.* Holden-Day, 1974, 39-43 [0071]
- **WONG.** *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking.* CRC Press, 1991 [0071]
- **CHAKRABARTTY et al.** *Protein Sci.*, 1994, vol. 3, 843-852 [0086]
- **ROTHBARD.** *Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications.* CRC Press, 2000 [0088]
- *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* Mack Publishing Company, 2005 [0131]
- *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins.* Taylor & Francis, 2000 [0131]
- *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* Pharmaceutical Press, 2000 [0131]
- *J Exp Med.*, 1969, vol. 129, 227-245 [0146]
- **BROOKS et al.** *J. Comput. Chem.*, 2009, vol. 30, 1545-1614 [0155]
- **MACKERELL et al.** *J. Phys. Chem. B*, 1998, vol. 102, 3586-3616 [0155]
- **ZOETE et al.** *J. Comput. Chem.*, 2011, vol. 32, 2359-2368 [0155]
- **PETTERSEN et al.** *J. Comput. Chem.*, 2004, vol. 25, 1605-1612 [0156]

15