

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 561**

51 Int. Cl.:

C07K 14/05 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2013 PCT/IB2013/058497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2013 E 13795574 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2895499**

54 Título: **Péptidos de penetración celular**

30 Prioridad:

13.09.2012 EP 12184311
13.09.2012 US 201261700432 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE GENÈVE (50.0%)
24 rue du Général-Dufour
1211 Genève 4/, CH y
LES HÔPITAUX UNIVERSITAIRES DE GENÈVE
(50.0%)

72 Inventor/es:

DEROUAZI, MADIHA;
WALKER, PAUL y
DIETRICH, PIERRE-YVES

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 734 561 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

Péptidos de penetración celular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos de penetración celular como agentes de suministro a las células para aplicaciones biológicas y médicas.

Antecedentes de la invención

10 La membrana plasmática de las células eucariotas es una barrera estrechamente controlada que protege a la célula de un flujo no regulado de moléculas bioactivas. En caso de moléculas pequeñas y proteínas u otros fármacos basados en macromoléculas que no son endógenos a la célula, atravesar la membrana plasmática puede implicar tanto el uso de un sistema de transporte natural como la difusión directa a través de la bicapa lipídica. Sin embargo, en muchos casos, ambos modos de entrada son ineficientes para las moléculas exógenas.

15 En la última década, los péptidos de penetración celular (CPP) se han convertido en vectores prometedores para suministrar diferentes agentes terapéuticos, incluyendo proteínas, a sus dianas. Los CPP son secuencias peptídicas que facilitan la translocación eficaz de proteínas a través de las membranas biológicas, independientemente de transportadores o receptores específicos. Los CPP también tienen la ventaja de una producción rentable. Desde el descubrimiento hace 20 años de la propiedad de translocación de la membrana de la proteína reguladora transactivadora del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH TAT), se han identificado diversos CPP, entre ellos penetratina (Antennapedia homeodomain), VP22 (virus del herpes simplex) y poliarginina sintética (polyR). Se han vinculado diferentes cargas a los CPP con la perspectiva del diseño de nuevas vacunas.

20 Recientemente, se ha demostrado que el activador transcripcional ZEBRA de la cremallera de leucina básica del virus de Epstein-Barr atraviesa la membrana externa de células vivas y se acumula en el núcleo de los linfocitos. Más particularmente, se ha demostrado que la región mínima de ZEBRA, que es necesaria para la capacidad de penetración celular del transactivador ZEBRA del virus de Epstein-Barr, abarca desde el residuo 170 al residuo 220 de ZEBRA y que tanto el dominio de unión al ADN y el dominio de dimerización contenido en esa región son necesarios para las propiedades de penetración celular (Rothe et al. 2010, J. Biological Chemistry 285 (26): 20224-20232). Por ejemplo, la WO 2011/036211 A1 describe polipéptidos que comprenden la secuencia del dominio FERM de una proteína ERM o variantes de secuencia de la misma, que son adecuados para su uso en el tratamiento de cánceres dependientes de ErbB2, en particular de tumores que sobreexpresan ErbB2 o que expresan formas mutadas del gen ErbB2. Estos polipéptidos pueden estar fusionados, por ejemplo, con otro polipéptido que comprende o consiste en una secuencia que permite la transducción al citoplasma celular, por ejemplo al dominio de transducción de proteínas ZEBRA MD11, que tiene una longitud de 45 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 178 - 222 de ZEBRA.

35 Muchos CPP tienen inconvenientes cuando se considera su uso como vehículos para el suministro de moléculas de carga al interior de la célula. Por ejemplo, pueden causar efectos secundarios graves en la célula, como la fuga citoplásmica debido a la ruptura de la membrana o la interferencia con el funcionamiento normal de las proteínas de membrana, o pueden causar efectos tóxicos celulares y/o efectos inmunogénicos. Además, algunos CPP pueden degradarse rápidamente en el citoplasma o permanecer atrapados en los endosomas para ser degradados en los lisosomas. Igualmente, algunos CPP no pueden liberar la molécula de carga o no tienen un amplio espectro para abordar o liberar la molécula de carga.

40 Por tanto, todavía existe la necesidad de un vehículo mejorado capaz de suministrar una amplia variedad de moléculas de carga al interior de una célula, que tenga una alta eficiencia de captación de la molécula de carga, así como una baja toxicidad. En el contexto de las vacunas, también sería ventajoso si el vehículo de suministro no estuviera restringido a una sola vía para la internalización de la molécula de carga y pudiera administrarse tanto al citosol como a los endosomas para la presentación de antígenos. La presente invención resuelve este problema proporcionando CPP que permiten el suministro y la presentación eficientes de, por ejemplo, determinantes antigénicos en la superficie celular de las células presentadoras de antígeno. Así, los CPP de la invención son útiles como vehículos para el suministro de diversas moléculas de carga, tales como polipéptidos y proteínas, polisacáridos, lípidos o sus combinaciones, así como ácidos nucleicos, medicamentos de moléculas pequeñas y agentes de formación de imágenes.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un péptido de penetración celular caracterizado porque:

50 a) la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido está comprendida entre 15 y 30 aminoácidos en total; y

b) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de la región que se extiende desde el residuo 170 al residuo 220 de ZEBRA, donde, opcionalmente, se han sustituido, eliminado y/o agregado 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sin eliminar la capacidad de penetración celular de dicho péptido;

c) con la condición de que la secuencia de dicho péptido de penetración celular no sea una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

Ac-RAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLL-NH₂;
 Ac-AKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL-NH₂;
 Ac-KFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLK-NH₂;
 Ac-FKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKQ-NH₂ y LEIKRYKNRVASRKCRKFKQ.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga, donde dicha molécula de carga se selecciona entre epítomos patogénicos y/o epítomos tumorales y el péptido de penetración celular se caracteriza porque:

a) la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de penetración celular está comprendida entre 15 y 30 aminoácidos en total; y

b) dicho péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, dicho dominio mínimo extendiéndose desde el residuo 170 al residuo 220 de ZEBRA de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, donde, opcionalmente, se han sustituido, eliminado y/o agregado 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sin eliminar la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a polinucleótidos que codifican dicho péptido de penetración celular o dicho complejo, donde la molécula de carga incluida en el complejo es un péptido, un polipéptido o una molécula de carga proteica, así como a vectores que contienen tales polinucleótidos.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a células cargadas con el complejo tal como se ha definido anteriormente, donde dichas células son preferentemente células presentadoras de antígeno.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a composiciones que comprenden: (i) un péptido de penetración celular de la invención, (ii) un complejo de la invención, (iii) un polinucleótido de la invención, (iv) un vector de la invención o v) células cargadas con un complejo según la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a las composiciones mencionadas anteriormente para su uso como medicamentos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción de las figuras

Figura 1: muestra los resultados de la presentación restringida de MHC de clase I después de la carga en células dendríticas de los polipéptidos de fusión CPP1-OVA y CPP2-OVA. Se cargaron células dendríticas derivadas de médula ósea durante 4 h con 0,3 µM de los respectivos polipéptidos de fusión CPP-OVA y se maduraron durante la noche con LPS. Después de 5 días de coincubación con esplenocitos de ratones transgénicos TCR OT1, se evaluó la presentación restringida de MHC clase I correcta del epítipo OVA mediante dilución con CFSE de células T específicas de OVA proliferantes. Controles negativos con células T solamente (A) o con células T co-incubadas con células dendríticas de médula ósea maduradas que no se pulsaron con los polipéptidos de fusión (B); Controles positivos con células T incubadas con péptidos (C) o con péptidos de células dendríticas derivadas de médula ósea madura pulsada (D); CPP1-OVA (E); CPP2-OVA (F).

Figura 2: muestra la respuesta inmune policlonal después de la vacunación de ratones con los polipéptidos de fusión que comprenden CPP1 o CPP2 y una carga peptídica de ovoalbúmina. Los ratones se vacunaron dos veces vía subcutánea en intervalos de 14 días con 20 µg de cada polipéptido de fusión CPP-OVA y, se inyectaron 100 µg de anti-CD40 y 50 µg de poli-IC vía intramuscular 10 días después del refuerzo; los ratones se sacrificaron y los esplenocitos se tiñeron con un multímero y anti-CD 8. Control negativo con PBS (A); CPP1-OVA (B); CPP2-OVA (C).

Descripción detallada de la invención

Los términos "péptidos que penetran en la célula" ("CPP") se usan generalmente para designar péptidos cortos que son capaces de transportar diferentes tipos de moléculas de carga a través de la membrana plasmática y, por tanto, facilitan la captación celular de diversas cargas moleculares (desde nanopartículas a moléculas químicas pequeñas, macromoléculas y grandes fragmentos de ADN). La molécula de "carga" está asociada al péptido que penetra en la célula ya sea mediante enlace químico vía enlaces covalentes o por interacciones no covalentes. Los péptidos de penetración celular típicamente tienen una composición de aminoácidos que contiene una alta abundancia relativa de aminoácidos cargados positivamente, como lisina o arginina, o una secuencia que contiene un patrón alternativo de aminoácidos

polares/cargados y aminoácidos hidrófobos no polares. Estos dos tipos de estructuras se denominan policatiónicas o anfipáticas, respectivamente. Los péptidos de penetración celular tienen diferentes tamaños, secuencias de aminoácidos y cargas, pero todos los CPP tienen una característica común, que es la capacidad de translocar la membrana plasmática y facilitar el suministro de diversas cargas moleculares al citoplasma o a un orgánulo de una célula. En la actualidad, las teorías de la translocación de CPP distinguen tres mecanismos de entrada principales: penetración directa en la membrana, entrada mediada por endocitosis y translocación por formación de una estructura transitoria. La transducción de CPP es un campo de investigación en curso. Los péptidos de penetración celular han encontrado numerosas aplicaciones en la medicina como agentes de administración de fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer, y como inhibidores virales, así como agentes de contraste para el marcaje celular y la obtención de imágenes.

"Molécula de carga" designa aquí la molécula unida a un péptido de penetración celular por una unión covalente o no covalente, cuya internalización celular se facilita o permite por la presencia de dicho péptido de penetración celular. En la presente invención, las "moléculas de carga" incluyen péptidos, proteínas, polisacáridos, lípidos, combinaciones de los mismos incluyendo lipoproteínas y glucolípidos, ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARNs, ARNs, oligonucleótidos antesentido, ADN señuelo, plásmido), medicamentos de moléculas pequeñas (por ejemplo ciclosporina A, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico), agentes de imagen (por ejemplo fluoróforos, puntos cuánticos (QD), trazadores radioactivos, quelatos metálicos como quelatos de gadolinio (Gd^{3+}) de bajo peso molecular, óxido de hierro superparamagnético (SPIO)). Se entiende que, cuando la molécula de carga es un péptido, un polipéptido o una proteína, puede comprender uno o más péptidos, polipéptidos o proteínas unidos entre sí. Además, cuando la molécula de carga es un ácido nucleico, dicho ácido nucleico puede comprender uno o más ácidos nucleicos, en cada caso codificando un péptido o polipéptido. Igualmente la molécula de carga puede ser una combinación de una proteína, un lípido y/o un polisacárido, incluyendo lipoproteínas y glucolípidos.

Los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" y las variaciones de estos términos se refieren a un péptido, oligopéptido, oligómero o proteína, incluyendo proteínas de fusión, que comprenden al menos dos aminoácidos unidos uno al otro por un enlace peptídico normal o modificado, tal como en el caso de péptidos esotéricos, por ejemplo. Estos términos también incluyen aquí "peptidomiméticos", que se definen como análogos de péptidos que contienen elementos estructurales no peptídicos, cuyos péptidos son capaces de imitar o antagonizar la(s) acción(es) biológica(s) de un péptido parental natural. Un peptidomimético carece de características peptídicas clásicas, tales como enlaces peptídicos escindibles enzimáticamente. Un péptido o polipéptido puede estar compuesto por aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos definidos por el código genético. Puede estar compuesto de L-aminoácidos y/o D-aminoácidos. Un péptido o polipéptido también puede estar compuesto por aminoácidos modificados mediante procesos naturales, como procesos de maduración postraduccionales, o por procesos químicos, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales modificaciones están bien detalladas en la literatura. Estas modificaciones pueden aparecer en cualquier parte del polipéptido: en el esqueleto peptídico, en la cadena de aminoácidos o incluso en los extremos carboxilo o amino terminal. Un péptido o polipéptido puede estar ramificado después de una ubiquitinación o ser cíclico, con o sin ramificación. Este tipo de modificaciones pueden ser resultado de procesos postraduccionales naturales o sintéticos, bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las modificaciones peptídicas o polipeptídicas pueden incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, fijación covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, fijación covalente de un lípido o de un derivado lipídico, fijación covalente de un fosfatidilinositol, reticulación covalente o no covalente, ciclación, formación de enlaces desulfuro, desmetilación, glicosilación incluyendo pegilación, hidroxilación, yodación, metilación, mirestoilación, oxidación, procesos proteolíticos, fosforilación, prenilación, racemización, senoloilación, sulfatación, adición de aminoácidos como arginilación o ubiquitinación. Dichas modificaciones están bien detalladas en la literatura (Proteins Structure and Molecular Properties (1993) 2ª Ed., T. E. Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York; Seifter et al. (1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 y Rattan et al., (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 48-62).

Los términos "internalización celular" de la molécula de carga ligada al péptido de penetración celular en general significa el transporte de la molécula de carga a través de la membrana plasmática y, por tanto, la entrada de la molécula de carga en la célula. Dependiendo del caso particular, la molécula de carga puede entonces liberarse en el citoplasma, dirigirse a un orgánulo intracelular o presentarse en la superficie celular.

El término "ZEBRA" (también conocido como Zta, Z, EB1 o BZLF1) en general significa el activador transcripcional de cremallera de leucina básica (bZIP) del virus de Epstein-Barr (EBV). El dominio mínimo de ZEBRA, que exhibe propiedades de penetración celular, se ha identificado abarcando desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de ZEBRA. La secuencia de aminoácidos de ZEBRA se describe bajo el número de acceso de NCBI YP_401673 y comprende 245 aminoácidos mostrados en la SEQ ID NO: 23.

El término "epítipo", también conocido como "determinante antigénico", es la parte de un antígeno reconocida por el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, células B o células T. En la presente solicitud, el término "epítipo" se usa principalmente para designar epítipos de células T, que están presentes en la superficie de una célula presentadora de antígeno, donde se unen al Complejo de Histocompatibilidad Principal (MHC). Los epítipos de células T

presentados por las moléculas MHC de clase I son típicamente, pero no exclusivamente, péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que las moléculas de MHC clase II presentan péptidos más largos, generalmente, pero no exclusivamente, de entre 12 y 25 aminoácidos de longitud.

5 Los términos "epítipo CD4⁺" o "epítipo restringido CD4⁺" designan aquí un epítipo reconocido por una célula T CD4⁺, dicho epítipo consistente en un fragmento de antígeno en el surco de una molécula MHC de clase II.

Los términos "epítipo CD8⁺" o "epítipo restringido CD8⁺" designan aquí un epítipo reconocido por una célula T CD8⁺, dicho epítipo consistente en un fragmento de antígeno en el surco de una molécula de MHC de clase I.

Los términos "presentación de epítipos en el contexto de MHC de clase I" se refieren a un epítipo CD8⁺ que se encuentra en el surco de una molécula de MHC clase I en la superficie de una célula.

10 Los términos "presentación de epítipos en el contexto de MHC clase II" se refieren a un epítipo CD4⁺ que se encuentra en el surco de una molécula de MHC clase II en la superficie de una célula.

Los términos "presentación de epítipos en el contexto de CDI" se refieren a un epítipo lipídico que se encuentra en el surco de un clúster de diferenciación 1 de 1 de una molécula en la superficie de una célula.

15 "MHC clase I" designa una de las dos clases primarias de las Moléculas del Complejo de Histocompatibilidad. Las moléculas MHC de clase I (también denominadas "MHC I") se encuentran en cada célula nucleada del cuerpo. La función de las MHC clase I es mostrar un epítipo a las células citotóxicas (CTL). En los seres humanos, las moléculas MHC de clase I consisten en dos cadenas polipeptídicas, α y β 2-microglobulina (b2m). Solo la cadena α es polimórfica y está codificada por un gen HLA, mientras que la subunidad b2m no es polimórfica y está codificada por el gen Beta-2 de la microglobulina.

20 "MHC clase II" designa la otra clase primaria de moléculas del Complejo de Histocompatibilidad Principal. Las moléculas MHC de clase II (también denominadas "MHC II") se encuentran solo en unos pocos tipos de células especializadas, incluyendo macrófagos, células dendríticas y células B, todas ellas células dedicadas a la presentación de antígenos (APC).

25 "Epítipo tumoral" significa aquí un epítipo de un antígeno asociado a tumor o de un antígeno específico de tumor. Por ejemplo, epítipos tumorales incluyen epítipos de glioma.

30 "Epítipo de patógeno" significa aquí un epítipo de una proteína antigénica, un polisacárido antigénico, un lípido antigénico, una lipoproteína antigénica o un glucolípido antigénico de un patógeno, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares. Proteínas antigénicas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas o glucolípidos de patógenos incluyen aquí proteínas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas y glucolípidos, respectivamente, de patógenos responsables de enfermedades que pueden ser un objetivo para la vacunación, incluyendo, por ejemplo, amebiasis, ántrax, úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*), calicivirus asociado a diarrea, campylobacter diarrea, Cáncer de cuello uterino (Virus del papiloma humano), enfermedades genitales asociadas a *Chlamydia trachomatis*, cólera, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre del dengue, difteria, fiebre hemorrágica por ébola, diarrea enterotoxigénica por *Escherichia coli* (ETEC), cáncer gástrico (*Helicobacter pylori*), gonorrea, enfermedades asociadas a estreptococo del grupo A, enfermedades asociadas a estreptococo del grupo B, Neumonía por *Haemophilus influenzae* B y enfermedad invasiva, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, diarrea por hepatitis E, úlceras genitales por herpes simplex tipo 2, VIH/SIDA, enfermedad de anquilostoma, influenza, encefalitis japonesa, Fiebre de Lassa, Leishmaniasis, Leptospirosis, cáncer de hígado (Hepatitis B), cáncer de hígado (Hepatitis C), Enfermedad de Lyme, paludismo, fiebre hemorrágica de Marburg, sarampión, paperas, cáncer nasofaríngeo (virus de Epstein-Barr), meningitis por *Neisseria meningitidis*, parainfluenza asociada a neumonía, tos ferina, poliomiéltis, rabia, neumonía respiratoria del virus sincitial (VSR), fiebre del Valle del Rift, Rotavirus diaorrea, rubéola, esquistosomiasis, enfermedades asociadas al síndrome respiratorio agudo severo (SARS), shigelosis, viruela, enfermedades asociadas a *Staphylococcus aureus*, cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), *Streptococcus pneumoniae* y enfermedad invasiva, tétanos, encefalitis transmitida por garrapatas, tracoma, tuberculosis, tularaemia, fiebre tifoidea, enfermedad asociada al virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla.

45 El término "ácidos nucleicos inhibidores pequeños" (ANSI) se refiere a ácidos nucleicos cortos utilizados en estrategias dirigidas al reconocimiento del ARNm y su sub-regulación en función de su acción antisentido. Este término abarca oligonucleótidos antisentido, ácidos nucleicos catalíticos como ribozimas y desoxirribozimas, así como pequeños ARN interferentes (ARNsi).

50 El término "ARNsi" se refiere a ARN interferente pequeño que es un ARN de cadena simple o doble (aproximadamente 19-23 nucleótidos) capaz de acallar o silenciar un ARNm dirigido desde un gen diana. Los ARNsi artificiales se pueden sintetizar químicamente como oligonucleótidos o clonarse en un plásmido o un vector viral (adenovirus, retrovirus o lentivirus) como un ARN corto (ARNsh) para generar una transfección transitoria o estable en cualquier tipo de células

(Martin et al., 2007), Ann. Rev. Genomics Hum. Genet., 8:81-108; Kofschoten et al., 2007, Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab., 3(12):827-34; Huang et al., 2008, Expert. Opin. Ther. Targets, 12(5), 637-645).

Tal como se usa aquí, "tratamiento" y "tratar" en general significan obtener un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir o prevenir parcialmente una enfermedad, síntoma o condición de la misma y/o puede ser terapéutico, en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, condición, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa aquí abarca cualquier tratamiento de una enfermedad de un mamífero, en particular un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado como padeciéndola, como una intervención preventiva asintomática temprana; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o de sus síntomas o afecciones, como la mejora o la reparación de daños. En particular, los métodos, usos, formulaciones y composiciones de acuerdo con la presente descripción comprendidos en la invención son útiles en el tratamiento de cánceres o enfermedades infecciosas y/o en la prevención de la evolución de cánceres en una etapa avanzada o metastásica en pacientes con cáncer en etapa temprana, mejorando así la estadificación del cáncer. Cuando se aplica al cáncer, la prevención de una enfermedad o trastorno incluye prevenir la aparición o el desarrollo de un cáncer en un individuo identificado como en riesgo de desarrollarlo, por ejemplo, debido a la aparición en el pasado de dicho cáncer en el círculo familiar del individuo, y la prevención de la infección con patógenos promotores de tumores, por ejemplo virus de Epstein-Barr (EBV), virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus del herpes humano 8 (HHV8), virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), poliomavirus de células de Merkel (MCV) y Helicobacter pylori. También está cubierto por los términos "prevención/tratamiento" de un cáncer la estabilización de un cáncer ya diagnosticado en un individuo. Por "estabilización" se entiende la prevención de la evolución del cáncer a una etapa avanzada o metastásica en pacientes con cáncer en etapa temprana.

El término "sujeto" tal como se usa aquí se refiere a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados en la presente invención incluyen seres humanos, primates, animales domésticos como ganado vacuno, ovejas, cerdos, caballos y roedores de laboratorio.

El término "cantidad efectiva" tal como se usa aquí se refiere a una cantidad de al menos un péptido de penetración celular, de un complejo que comprende dicho péptido de penetración celular y una molécula de carga, de células cargadas con dicho complejo, de una composición o formulación farmacéutica de los mismos según la invención que provoca la respuesta biológica o medicinal buscada en un tejido, sistema, animal o humano. En una realización, la cantidad efectiva es una "cantidad terapéuticamente eficaz" para aliviar los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. En otra realización, la cantidad efectiva es una "cantidad profilácticamente eficaz" para la profilaxis de los síntomas de la enfermedad o afección que se previene. El término también incluye aquí la cantidad de polipéptido activo suficiente para reducir la progresión de la enfermedad, en particular para reducir o inhibir el crecimiento o infección del tumor y, por tanto, provocar la respuesta que se busca, en particular, tal respuesta podría ser una respuesta inmune dirigida contra los epítomos comprendidos en la molécula de carga (es decir, una "cantidad efectiva de inhibición").

El término "eficacia" de un tratamiento de acuerdo con la invención puede medirse en base a los cambios en el transcurso de la enfermedad en respuesta a un uso o a un método de acuerdo con la presente descripción que comprende la invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento contra el cáncer se puede medir por la reducción del volumen del tumor y/o el aumento del tiempo de supervivencia sin progresión y/o por una disminución del riesgo de recaída después de un cáncer primario. Más específicamente para el cáncer tratado con inmunoterapia, la evaluación de la eficacia puede realizarse por el espectro de patrones clínicos de respuesta antitumoral para agentes inmunoterapéuticos a través de nuevos criterios de respuesta relacionados con el sistema inmunitario (irRC), que se adapta de Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) y World Health Organization (WHO) criteria (J. Natl. Cancer Inst. 2010, 102(18): 1388-1397). La eficacia de la prevención de enfermedades infecciosas se evalúa finalmente mediante estudios epidemiológicos en poblaciones humanas, que a menudo se correlacionan con títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros e inducción de respuestas de células T específicas de patógenos multifuncionales. La valoración preclínica puede incluir la resistencia a la infección después del desafío con patógenos infecciosos. El tratamiento de una enfermedad infecciosa se puede medir por la inhibición del crecimiento del patógeno o la eliminación del patógeno (y, así, la ausencia de detección del patógeno), correlacionando con anticuerpos específicos del patógeno y/o respuestas inmunitarias de células T.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en una forma tal que permiten que la actividad biológica del (de los) ingrediente(s) activo(s) sea inequívocamente eficaz y que no contienen ningún componente adicional tóxico para los sujetos a los que dicha formulación se administra.

Péptidos de penetración celular y complejos de acuerdo con la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido de penetración celular caracterizado porque:

- a) la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido está comprendida entre 15 y 30 aminoácidos en total, tal como 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos en total; y

- b) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 al residuo 220 de ZEBRA (SEQ ID NO: 23), donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o adicionados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido;
- 5 c) con la condición de que la secuencia de dicho péptido de penetración celular no sea una secuencia seleccionada del grupo consistente en:
 Ac-RAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLL-NH₂;
 Ac-AKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL-NH₂;
 Ac-KFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLK-NH₂;
 10 Ac-FKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKQ-NH₂ y LEIKRYKNRVASRKCRKFKQ.

La capacidad de penetración celular, o de internalización, del péptido de penetración celular o del complejo que comprende dicho péptido de penetración celular de acuerdo con la invención puede comprobarse mediante métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo citometría de flujo o microscopía de fluorescencia de células vivas y fijas, inmunocitoquímica de células transducidas con dicho péptido o complejo, y Western blot.

- 15 En una realización ventajosa, las variantes o fragmentos del péptido de penetración celular según la invención además retienen la capacidad de dicho péptido para presentar una molécula de carga proteica como epítopos en la superficie de una célula, como una célula presentadora de antígeno, en el contexto de moléculas MHC clase I y/o MHC clase II.

La capacidad del péptido de penetración celular o del complejo que comprende dicho péptido de penetración celular para presentar una molécula de carga proteica como epítopos en la superficie de una célula en el contexto de las moléculas de MHC de clase I y/o MHC de clase II puede verificarse mediante métodos estándar conocidos del experto en la materia, incluyendo la capacidad para estimular la proliferación y/o la función de células T CD4⁺ o CD8⁺ restringidas por MHC con especificidad para estos epítopos.

20

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención no es la SEQ ID NO: 13.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención no es la SEQ ID NO: 14.

- 25 En otra realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención comprende una Cys (C) sustituida en una Ser (S), en el equivalente de la posición 189 con respecto a la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de SEQ ID NO: 23.

En una realización, la invención se refiere a un el péptido de penetración celular caracterizado porque:

- 30 a) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 15, y como máximo 30 aminoácidos; y

b) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende:

(i) la SEQ ID NO: 1, o

(ii) una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1, excepto que 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

- 35 De acuerdo con un aspecto de la invención, el péptido de penetración celular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un aminoácido sustituido de forma conservadora en comparación con la secuencia de referencia, lo que significa que un residuo aminoácido dado es reemplazado por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares.

40 En general, las sustituciones de uno o más aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos de referencia deben hacerse de forma conservadora. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, como He, Val, Leu o Ala por otro, o las sustituciones de un residuo polar por otro, como entre Lys y Arg, Glu y Asp o Gln y Asn. Son bien conocidas otras de tales sustituciones conservativas, por ejemplo sustituciones de regiones completas que tienen propiedades hidrofóbicas similares (Kyte y Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157(1): 105- 132). Las sustituciones de uno o más L-aminoácidos con uno o más D-aminoácidos deben considerarse sustituciones conservativas en el contexto de la presente invención. Sustituciones de aminoácidos ilustrativas se muestran en la Tabla 1 siguiente:

45

Tabla 1

Residuos originales	Ejemplos de sustituciones
Ala (A)	Val, Leu, Ile, Gly
Residuos originales	Ejemplos de sustituciones
Arg (R)	His, Lys
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
Hes (H)	Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, His
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Tyr, Trp, Met
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

Así, en otro aspecto, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención se caracteriza porque:

- 5 a) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos de una longitud de al menos 15 y como máximo 30 aminoácidos; y
- 5 b) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6 donde 0,1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido, donde
- 10 X₁ es K, R, o H
 X₂ es R, K, o H
 X₃ es Y, W, o F
 X₄ es K, R, o H
 X₅ es N o Q
 X₆ es R, K, o H
 X₇ es V, I, M, L, F, o A
 15 X₈ es A, V, L, I, o G
 X₉ es S o T
 X₁₀ es R, K, o H
 X₁₁ es K, R, o H
 X₁₃ es R, K, o H
 20 X₁₄ es A, V, L, I, o G
 X₁₅ es, K, R, o H
 X₁₆ es F, L, V, I, Y, W, o M

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁ es K.

- 25 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₂ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₃ es Y.

- 30 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₄ es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₅ es N.

ES 2 734 561 T3

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₆ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₇ es V.

5 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₈ es A.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₉ es S.

10 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₀ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₁ es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₃ es R.

15 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₄ es A.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₅ es K.

20 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₆ es F.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde X₁₇ es K.

25 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en referencia a la SEQ ID NO: 6 donde el aminoácido en la posición equivalente a la posición 12 con respecto a la SEQ ID NO: 6 es Ser (S).

En un aspecto más particular, dicho péptido de penetración celular comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 7, donde

30 X₁ es K o R
X₂ es R o K
X₃ es Y, W, o F
X₄ es K o R
X₅ es N o Q
X₆ es R o K
X₇ es V, I, M o L
35 X₈ es A o G
X₉ es S o T
X₁₀ es R o K
X₁₁ es K o R
X₁₃ es R o K
40 X₁₄ es A o G
X₁₅ es K o R
X₁₆ es F, Y, o W
X₁₇ es K o R.

45 En particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

En otra realización, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, la invención se refiere a un péptido de penetración celular que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

En otra realización particular, dicho péptido de penetración celular comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

- 5 En otra realización, la invención se refiere a un péptido de penetración celular que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10.

Un experto en la técnica entenderá que la secuencia de aminoácidos primaria del péptido de penetración celular de la invención puede modificarse adicionalmente después de la traducción, tal como por glicosilación o fosforilación, sin apartarse de la invención.

- 10 En una realización adicional, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención opcionalmente comprende además, aparte de su secuencia de aminoácidos como se describe anteriormente, cualquiera de o cualquier combinación de:

- i) una señal de localización nuclear (NLS). Dichas señales son bien conocidas por los expertos y se describen en Nair et al. (2003, Nucleic Acids Res. 31(1): 397- 399)
- 15 ii) un péptido dirigido a diana, incluyendo péptidos buscadores de tumores como aquellos descritos en Kapoor et al. (2012, PLoS ONE 7(4): e35187) y se enumeran en <http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope/general.php>?

En otra realización, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención está unido a una molécula de carga y facilita la internalización celular de dicha molécula de carga.

- 20 Así, otro aspecto de la invención se refiere a un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga, donde dicha molécula de carga se selecciona entre epítopos patogénicos y/o tumorales y el péptido de penetración celular se caracteriza porque:

- a) la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de penetración celular está comprendida entre 15 y 30 aminoácidos en total; y
- 25 b) péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 al residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de SEQ ID NO: 23, donde opcionalmente 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

La molécula de carga puede estar unida a la parte C-terminal o a la parte N-terminal del péptido de penetración celular.

- 30 En una realización particular, la molécula de carga que está unida al péptido de penetración celular o que está comprendida en el complejo de acuerdo con la invención puede seleccionarse del grupo consistente en: (i) un péptido, un polipéptido o una proteína, (ii) un polisacárido, (iii) un lípido, (iv) una lipoproteína, (v) un glucolípido, (vi) un ácido nucleico, (vii) un fármaco o toxina de molécula pequeña y (viii) un agente de imagen o de contraste.

- 35 Se entiende que la molécula de carga puede comprender más de un péptido, polipéptido o proteína, más de un polisacárido, más de un lípido, más de una lipoproteína, más de un glucolípido, más de un ácido nucleico, más de un medicamento o toxina de molécula pequeña, más de un agente de imagen o de contraste, o combinaciones de los mismos.

La molécula de carga que está unida al péptido de penetración celular o que está comprendida en el complejo de acuerdo con la invención se selecciona entre epítopos de patógenos y/o epítopos de tumores.

- 40 Una realización se refiere a un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga, donde dicha molécula de carga es un péptido, un polipéptido o una proteína.

- 45 Ejemplos de moléculas de carga de naturaleza peptídica, polipeptídica o proteica incluyen epítopos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas terapéuticas, factores de transcripción, transactivadores y péptidos señuelo. Por ejemplo, la molécula de carga puede comprender epítopos de CD4⁺ y/o epítopos de CD8⁺ correspondientes a determinante(s) antigénico(s) de un antígeno asociado a tumor, un antígeno específico de tumor o una proteína antigénica de un patógeno. Los epítopos CD4⁺ comprendidos en el polipéptido de la invención en general, y preferiblemente, consisten en aproximadamente 12-25 aminoácidos. También pueden consistir en aproximadamente 8-25 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos. Los epítopos CD8⁺ comprendidos en el polipéptido de la invención en general, y preferiblemente, consisten en aproximadamente 8-11 aminoácidos. También pueden consistir en aproximadamente 8-15 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos.

- En una realización específica, el complejo de acuerdo con descripción que comprende la invención incluye una molécula de carga seleccionada de epítomos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas terapéuticas, factores de transcripción, transactivadores y péptidos señuelo.
- 5 El complejo de acuerdo con la invención comprende una molécula de carga que comprende uno o más epítomos que son epítomos tumorales y/o epítomos de patógenos como se definen aquí. En una realización específica, el complejo de acuerdo con la invención comprende una molécula de carga que comprende epítomo(s) de un antígeno asociado a tumor, un antígeno específico de tumor y/o una proteína antigénica de un patógeno, incluyendo proteínas antigénicas de virus, bacterias, hongos, protozoos y de parásitos multicelulares.
- 10 En una ilustración particular de la invención, dichos epítomos serán presentados la superficie celular en un contexto MHC clase I y/o MHC clase II.
- Ejemplos de moléculas de carga dentro de la categoría de péptido, polipéptido o proteína incluyen una combinación de múltiples epítomos de glioma, como aquellos descritos en Novellino et al. (2005, *Cancer Immunol Immunother*, 54 (3): 187-207), Vigneron et al. (2013, *Cancer Immun.* 13:15).
- 15 En otro aspecto de la invención, todos estos epítomos de glioma no están unidos al mismo péptido de penetración celular, lo que formaría un único complejo según la invención, sino que están unidos, individualmente o por grupos de al menos 2 epítomos, a péptidos de penetración celular independientes, formando al menos 2 complejos distintos de acuerdo con la invención. En una realización ventajosa, el complejo según la invención comprende un péptido de penetración celular y epítomos y permite el transporte y la presentación de dichos epítomos en la superficie celular de células presentadoras de antígenos en un contexto de clase I de MHC y clase II de MHC, y es, por tanto, útil en la vacunación y la inmunoterapia.
- 20 En un aspecto particular, el complejo según la invención comprende un espaciador o enlazador que son restos no inmunológicos escindibles que unen el péptido de penetración celular y la molécula de carga y/o que enlazan epítomos sucesivos comprendidos en una molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica y/o que vinculan moléculas de carga sucesivas y/o se desponen en la parte C-terminal de la molécula de carga.
- 25 Dicho espaciador puede ser peptídico o no peptídico, el enlace entre dos componentes del complejo según la invención puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente.
- Un espaciador peptídico puede consistir en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, por ejemplo. La secuencia de aminoácidos del espaciador peptídico puede ser idéntica a la de la región flanqueante N-terminal o C-terminal de la molécula de carga o de un epítomo de dicha molécula de carga. Alternativamente, un espaciador peptídico puede consistir en secuencias de aminoácidos no naturales, tales como una secuencia de aminoácidos que resulta de sustituciones de aminoácidos conservativas de dichas regiones flanqueantes naturales o secuencias de sitios de escisión conocidos para proteasas, tales como el sitio diana de enterocinasa (secuencia de aminoácidos DDDK, SEQ ID NO: 15), sitio diana del factor Xa (secuencia de aminoácidos IEDGR, SEQ ID NO: 16), sitio diana de trombina (secuencia de aminoácidos LVPRGS, SEQ ID NO: 17), sitio diana de la proteasa TEV (secuencia de aminoácidos ENLYFQG, SEQ ID NO: 18), sitio diana de la proteasa pre-escisión (secuencia de aminoácidos LEVLFQGP, SEQ ID NO: 19), aminoácidos policatiónicos, por ejemplo poli K, sitio diana de furina (secuencia de aminoácidos RX (R/K)R, SEQ ID NO: 20). En una realización particular, el espaciador peptídico no contiene ningún residuo Cys (C).
- 30
- 35
- Un espaciador no peptídico puede incluir ésteres, tioésteres o disulfuros.
- En un aspecto particular, el complejo según la invención comprende un espaciador o un enlazador, en particular un espaciador peptídico despuesto entre la secuencia del péptido de penetración celular y la carga peptídica, polipeptídica o proteica. Este espaciador peptídico puede ser seleccionado por un experto en la técnica de modo que pueda ser cortado por la maquinaria celular una vez que el complejo que comprende el péptido de penetración celular y la molécula de carga se haya internalizado, liberando así la carga libre del péptido de penetración celular dentro de la célula, orgánulo o en la superficie celular.
- 40
- En un aspecto más particular, dicho espaciador que une el péptido de penetración celular y la molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica, o un epítomo adyacente de la molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica, puede consistir en aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos, que corresponden a aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de la región flanqueante de dicha molécula de carga o epítomo adyacente.
- 45
- Cuando la molécula de carga comprende varios epítomos, estará claro para el experto en la técnica que cada uno de los epítomos comprendidos en el complejo de la invención puede estar directamente unido entre sí o unido vía espaciadores o enlazadores, como un espaciador peptídico que consiste en unos pocos aminoácidos. Alternativamente, cuando la molécula de carga comprende varios epítomos, también es posible que algunos epítomos comprendidos en el complejo de la invención estén directamente unidos entre sí y algunos otros epítomos estén unidos vía espaciadores o enlazadores, como un espaciador peptídico que consiste en unos pocos aminoácidos.
- 50

En un aspecto específico de la invención, dos epítomos sucesivos comprendidos en la molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica de la invención están unidos entre sí por espaciadores consistentes en las regiones flanqueantes naturales de dichos epítomos. Según una realización, el espaciador utilizado para unir un primer epítomo a un segundo epítomo consiste en hasta aproximadamente 8 aminoácidos correspondientes a hasta aproximadamente 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del primer epítomo, seguido de hasta aproximadamente 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del segundo epítomo. En una ilustración de la presente invención, el espaciador utilizado para vincular un primer epítomo ("epítomo 1") a un segundo epítomo ("epítomo 2") consiste en aproximadamente 8 aminoácidos correspondientes a cualquier combinación posible en el rango de: 0 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 8 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2 a 8 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 0 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, es decir, incluyendo 1 aminoácido flanqueante del epítomo 1 y 7 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, 2 aminoácidos flanqueantes de los epítomos 1 y 6 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, 3 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 5 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, 4 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 4 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, 5 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 3 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, 6 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 2 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2, 7 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 1 aminoácido flanqueantes del epítomo 2, 8 aminoácidos flanqueantes del epítomo 1 y 0 aminoácidos flanqueantes del epítomo 2. Se entenderá que el total de 8 aminoácidos que constituyen un espaciador que une dos epítomos sucesivos no es un valor absoluto y el espaciador también podría estar compuesto por un total de, por ejemplo, 3 aminoácidos, 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 9 aminoácidos o 10 aminoácidos. De manera similar, las combinaciones equivalentes mencionadas anteriormente también son una ilustración de la invención en la situación donde un espaciador tiene menos o más de 8 aminoácidos.

En otra ilustración particular de la presente invención, el espaciador utilizado para unir un primer epítomo ("epítomo 1") a un segundo epítomo ("epítomo 2") consiste en aproximadamente 4 aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. Más particularmente, dicha secuencia de aminoácidos del espaciador puede corresponder a los 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del epítomo 1 o del epítomo 2.

Un espaciador como el descrito anteriormente también se puede disponer en la parte C-terminal del último epítomo comprendido en la molécula de carga.

Ejemplos de un espaciador peptídico incluyen las secuencias de aminoácidos EQLE (SEQ ID NO: 11) o TEWT (SEQ ID NO: 12), por ejemplo, o cualquiera de sus sustituciones conservativas.

Otra realización se refiere a un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga donde dicha molécula de carga es un polisacárido, un lípido, una lipoproteína y/o un glucolípido, en particular un epítomo polisacárido, lipídico, lipoproteico y/o glucolipídico, que pueden ser epítomos de patógenos como se definen aquí.

En una ilustración particular, el complejo según la invención comprende una molécula de carga que incluye uno o más epítomos polisacáridos, lipídicos, lipoproteicos y/o glucolipídicos de un antígeno de un patógeno, incluyendo antígenos virales, bacterianos, fúngicos, protozoarios y de parásitos pluricelulares.

En una ilustración particular de la invención, dichos epítomos se presentarán en la superficie celular en un contexto MHC clase I y/o MHC clase II.

En otra ilustración de la invención, dichos epítomos lipídicos se presentarán en la superficie celular en un contexto CD1 (clúster de diferenciación 1).

Otra realización proporciona un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga donde dicha molécula de carga es un fármaco o una toxina de moléculas pequeñas.

Ejemplos de moléculas de carga dentro de la categoría de fármacos o toxinas de moléculas pequeñas incluyen ciclosporina A, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico, toxina diftérica, sunitiniba y aquellas moléculas reversadas en De wit Amer (2010, Neuro Oncol, 12(3): 304-16).

Otra realización más proporciona un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga donde dicha molécula de carga es un agente de imagen o de contraste.

Ejemplos de moléculas de carga dentro de la categoría de agentes de imagen o de contraste incluyen fluoróforos, puntos cuánticos (QD), quelatos metálicos como quelatos de gadolinio (Gd^{3+}) de bajo peso molecular y óxido de hierro superparamagnético (SPIO), trazadores radioactivos.

Otra realización proporciona un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga donde dicha molécula de carga es un ácido nucleico.

Ejemplos de moléculas de carga de ácido nucleico útiles en la invención incluyen ADN, ARN, ARNsi, ARNsh, oligonucleótidos antisentido, ADN señuelo, plásmidos, microARN.

5 Otra realización proporciona un complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga donde dicha molécula de carga es un ácido nucleico que codifica un péptido, polipéptido o proteína, en particular que codifica un péptido, polipéptido o proteína que comprende epítopos.

10 Ejemplos de moléculas de carga dentro de la categoría de ácidos nucleicos incluyen un ácido nucleico que codifica la molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica de acuerdo con la invención. Un ejemplo particular es un ácido nucleico que codifica epítopos comprendidos en la molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica de acuerdo con la invención. Otro ejemplo es un ácido nucleico que codifica una combinación de múltiples epítopos de glioma, como los descritos en Reardon et al (2013, Expert Rev Vaccines, 12(6): 597-615).

15 En otra realización ventajosa, el complejo según la invención comprende un péptido de penetración celular y un ácido nucleico que codifica epítopos y permite el transporte de dicho ácido nucleico dentro de la célula. El ácido nucleico transcrito puede luego transcribirse y traducirse para producir dichos epítopos dentro de la célula que, a su vez, se presentan en la superficie celular de células presentadoras de antígeno en un contexto de MHC de clase I y de clase II. Así, tal complejo es útil en la vacunación y la inmunoterapia.

En una realización de la invención, la molécula de carga puede estar unida covalente o no covalentemente al péptido de penetración celular, incluyendo mediante un espaciador peptídico como se describe aquí.

20 Las técnicas para unir el péptido de penetración celular y la molécula de carga están bien documentadas en la bibliografía y pueden depender de la naturaleza de la molécula de carga. Por ejemplo, los enlaces entre la molécula de carga y el péptido de penetración celular se pueden conseguir vía enlaces desulfuro escindibles mediante la síntesis en fase sólida paso a paso total o el acoplamiento de fragmentos en fase de solución o en fase sólida, enlace estable de amida, tiazolidina, oxima e hidrazina, enlace desulfuro, enlace estable de tiomaleimida, unión peptídica (incluyendo enlaces peptídicos entre aminoácidos de una proteína de fusión) o interacciones electrostáticas o hidrófobas.

Polinucleótidos que codifican los péptidos y complejos de proteínas de acuerdo con la invención

25 Otro aspecto de la invención se refiere a polinucleótidos que codifican el péptido de penetración celular o el complejo que comprende una molécula de carga peptídica, polipeptídica o proteica, de acuerdo con la invención.

30 En una realización, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención o que codifica un complejo según la invención que comprende dicho péptido de penetración celular unido covalentemente a una molécula de carga de péptido, polipéptido o proteica, posiblemente con espaciador(es) peptídico(s) como se describe aquí.

En una realización adicional, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención o que codifica un complejo que comprende dicho péptido de penetración celular unido covalentemente a una molécula de carga de péptido, polipéptido o proteica que comprende al menos un epítipo, posiblemente con espaciador(es) peptídico(s) como se describe aquí.

35 ***Producción y purificación de los péptidos de penetración celular y complejos de acuerdo con la invención***

Otro aspecto de la invención proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención.

40 Se pueden emplear numerosos sistemas de expresión, incluyendo, sin limitación, cromosomas, episomas y virus derivados. Más particularmente, los vectores recombinantes utilizados pueden derivarse de plásmidos bacterianos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos de cromosoma de levadura, virus como baculovirus, virus del papiloma como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela del zorro, virus de la pseudorrabia, retrovirus. Estos vectores recombinantes pueden ser también derivados de cósmidos o fagémidos. La secuencia de nucleótidos se puede insertar en el vector de expresión recombinante por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo aquellos descritos en MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al., 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

El vector recombinante puede incluir secuencias de nucleótidos que controlan la regulación de la expresión del polinucleótido, así como secuencias de nucleótidos que permiten la expresión y la transcripción de un polinucleótido de la invención y la traducción de un polipéptido de la invención, seleccionándose estas secuencias según las células huésped que se utilizan.

Así, por ejemplo, se puede integrar una señal de secreción apropiada en el vector recombinante de forma que el polipéptido, codificado por el polinucleótido de la invención, se dirigirá hacia el lumen del retículo endoplásmico, hacia el espacio periplásmico, en la membrana o hacia el medio extracelular. La elección de una señal de secreción apropiada puede facilitar la posterior purificación de la proteína.

5 En una realización adicional, la presente descripción describe una célula huésped que comprende un vector recombinante de acuerdo con la invención.

10 La introducción del vector recombinante en una célula huésped se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los descritos en BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Daves et al., 2ª ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, y MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, *supra*, como transfección por fosfato de calcio, transfección por DEAE dextrano, transfección, microinyección, transfección por lípidos catiónicos, electroporación, transducción o infección.

La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana como E. coli, células de hongos como células de levadura y de Aspergillus, Streptomyces, células de insecto, células de ovario de hámster chino (CHO), línea celular de ratón C127, línea celular BHK de hámster sirio, células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293).

15 Pueden emplearse células huésped, por ejemplo, para expresar un polipéptido de la invención. Después de la purificación por métodos estándar, el polipéptido de la invención se puede emplear en un método tal como se describe a continuación.

20 Es una realización adicional de la presente descripción describir un método para preparar un péptido de penetración celular de acuerdo con la invención o un complejo que comprende dicho péptido de penetración celular unido covalentemente a una molécula de carga de péptido, polipéptido o proteica, de acuerdo con la invención, que comprende cultivar una célula huésped como se mencionó anteriormente en un medio de cultivo y separar dicho péptido de penetración celular o complejo del medio de cultivo o separar dicho péptido de penetración celular o complejo del lisado de la célula huésped después de la lisis de la célula huésped.

25 En otra realización, los péptidos de penetración celular y complejos según la invención pueden prepararse mediante métodos de química sintética, como síntesis de péptidos en fase sólida. La purificación de estos péptidos puede llevarse a cabo por cualquier técnica conocida para la purificación de proteínas/péptidos. Técnicas ilustrativas incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y métodos de inmunoafinidad.

Es una realización adicional de la presente descripción describir un método para preparar un péptido de penetración celular de acuerdo con la invención que comprende sintetizar químicamente y purificar dicho péptido.

30 Otra realización de la presente descripción es describir un método para preparar un complejo de acuerdo con la invención que comprende un péptido de penetración celular unido covalentemente a una molécula de carga de péptido, polipéptido o proteica como se define aquí, que comprende sintetizar químicamente y purificar un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de penetración celular y la secuencia de aminoácidos de dicha molécula de carga de péptido, polipéptido o proteica.

35 En otra realización, el método de acuerdo con la presente descripción comprende sintetizar el péptido de penetración celular y la molécula de carga por separado y mezclar los péptidos purificados y la molécula de carga o bien unir covalentemente dicho péptido y la molécula de carga.

Células cargadas con los complejos según la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a células cargadas con el complejo de acuerdo con la invención. En una realización particular, las células son del paciente a tratar.

40 En una realización adicional, las células son células del sistema inmune tales como células presentadoras de antígeno o células madre, tales como células madre neurales.

En una realización, se proporcionan células presentadoras de antígeno cargadas con el complejo de acuerdo con la invención.

45 En una realización específica, las células presentadoras de antígeno se seleccionan entre células dendríticas, macrófagos y células B. Son preferentes las células dendríticas, en particular las células dendríticas (convencionales y plasmocitoides) del paciente a tratar.

El experto en la materia conoce métodos para extraer células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, del paciente. Éstos incluyen la recolección de monocitos o células madre hematopoyéticas de médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica. También incluyen el uso de células madre embrionarias (ES) y células madre

pluripotentes inducidas (iPS). Las células presentadoras de antígenos, en particular las células dendríticas o sus precursores, pueden enriquecerse mediante métodos que incluyen la elutriación y la separación basada en perlas magnéticas, lo que puede implicar el enriquecimiento de células precursoras CD14⁺.

5 El experto en la técnica conoce métodos para cargar el complejo de la invención en las células, en particular en las células presentadoras de antígenos mencionadas anteriormente, y preparar dichas células antes de su administración al paciente. La preparación de células dendríticas puede incluir su cultivo o diferenciación utilizando citoquinas, que pueden incluir GM-CSF e IL-4. También se pueden emplear líneas celulares dendríticas. La carga del complejo de la invención en las células, en particular en células dendríticas, puede implicar la co-incubación del complejo de la invención con las células en cultivo, haciendo uso de las propiedades intrínsecas del péptido de penetración celular (es decir, su capacidad de
10 internalización). El cultivo adicional de las células dendríticas así cargadas para inducir una maduración eficiente puede incluir la adición de citoquinas, incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF α , PGE2, IFN α y adyuvantes, que pueden incluir poli-IC, poli-ICLC (es decir, un complejo sintético de carboximetilcelulosa, ácido polinosínico-policitídilico, y ARN de doble hebra poli-L-lisina), y otros TLR (receptores tipo toll) y agonistas NLR (receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos).

15 Un aspecto adicional se refiere a las células de imagen usadas para la terapia celular, tales como células madre, células dendríticas, células T o células asesinas naturales, cargadas con el complejo según la invención donde la molécula de carga es un agente de imagen.

También es un objeto de la presente descripción describir un método para preparar células, en particular células presentadoras de antígenos, cargadas con el complejo de acuerdo con la invención como se mencionó anteriormente, que comprende transducir dichas células con el complejo de la invención, cultivar dichas células en un medio de cultivo y
20 separar dichas células del medio de cultivo.

En una realización particular, las células se cargan con complejo(s) que comprende(n) una molécula de carga donde dicha molécula de carga se selecciona entre (i) un péptido, polipéptido o proteína o (ii) un ácido nucleico.

25 En otra realización de la invención, las células cargadas con complejo(s) que comprenden epítomos de acuerdo con la invención presentan dichos epítomos en la superficie celular en los contextos de MHC de clase I y de clase II.

Composiciones y kits

La invención proporciona composiciones que comprenden al menos un componente seleccionado de:

- 30 i) un péptido de penetración celular de la invención,
ii) un complejo de la invención,
iii) un polinucleótido de la invención,
iv) un vector de la invención, y
v) una celda cargada con un complejo según la invención.

En una realización particular, la composición de la invención comprende más de uno de los componentes de (i) a (v).

35 En una ilustración de la invención, la composición comprende al menos dos péptidos diferentes según (i), al menos dos complejos diferentes según (ii), al menos dos ácidos nucleicos diferentes según (iii), al menos dos vectores diferentes según (iv) y/o al menos dos células diferentes según (v).

En otra ilustración, la composición de la invención comprende al menos dos complejos diferentes y/o al menos dos ácidos nucleicos diferentes de acuerdo con la invención.

40 En particular, la composición de la invención puede comprender más de un complejo de acuerdo con la invención, por ejemplo al menos dos complejos donde cada complejo comprende una o más moléculas de carga y donde dichas moléculas de carga son diferentes entre los complejos.

En una ilustración, la composición de la invención comprende al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende uno o más epítomos y donde dichos epítomos son diferentes entre los complejos.

45 En otra ilustración, la composición de la invención comprende al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más epítomos y donde dichos ácidos nucleicos son diferentes entre los complejos.

La presente invención también proporciona un complejo o células cargadas con dicho complejo, como se describe aquí, para uso como medicamento, en particular como una vacuna.

En una realización particular, la presente invención proporciona un complejo o células cargadas con dicho complejo, como se describe aquí, para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes y rechazos a trasplantes.

5 La descripción que comprende la invención proporciona composiciones farmacéuticas, en particular composiciones de vacunas, y métodos para tratar a un sujeto, preferiblemente un sujeto mamífero, con total preferencia un paciente humano que es susceptible de padecer o padece un trastorno médico, y en particular un trastorno que puede ser tratado por inmunoterapia, tal como cáncer, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios y rechazos a trasplantes.

10 Las composiciones farmacéuticas, en particular las composiciones de vacunas, o las formulaciones de acuerdo con la invención pueden administrarse como una formulación farmacéutica que puede contener un péptido de penetración celular o un complejo de acuerdo con la invención en cualquier forma aquí descrita.

Las composiciones farmacéuticas, en particular las composiciones de vacunas, o las formulaciones de acuerdo con la invención también pueden administrarse como una formulación farmacéutica que puede contener células presentadoras de antígeno cargadas con un complejo de acuerdo con la invención en cualquier forma aquí descrita.

15 Las composiciones de acuerdo con la invención, junto con un adyuvante empleado convencionalmente, un material inmunomodulador, un vehículo, diluyente o excipiente pueden conformarse como composiciones farmacéuticas y sus dosis unitarias, y como tales pueden emplearse en forma sólida, como comprimidos o cargadas en cápsulas, o en forma líquida, como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, todos para uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para su uso parenteral (incluyendo subcutáneo e intradérmico) por inyección o infusión continua. Las composiciones inyectables se basan típicamente en una solución salina estéril inyectable o una
20 solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Dichas composiciones farmacéuticas y sus formas de dosificación unitaria pueden comprender ingredientes en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y tales formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo en proporción al intervalo de dosificación diaria deseada a emplear.

25 Ejemplos de adyuvantes y/o materiales inmunomoduladores adecuados incluyen MPL® (Corixa), minerales basados en aluminio que incluyen compuestos de aluminio (genéricamente llamados Alum), ASO1-4, MF59, fosfato de calcio, liposomas, Iscom, ácido poliinosínico:policitidílico (poli-IC), incluyendo su forma estabilizada poli-ICLC (Hiltonol), oligodesoxinucleótidos CpG, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), lipopolisacáridos (LPS), Montanida, polilactida co-glicólido (PLG), flagelina, saponinas del árbol soapbark (QS21), compuestos de aminoalquil glucosamida (por ejemplo RC529), péptidos antibacterianos de dos componentes con oligodesoxinucleótidos
30 sintéticos (por ejemplo IC31), Imiquimod, Resiquimod, secuencias inmunoestimuladoras (ESS), monofosforil lípido A (MPLA), lipopéptido estimulante de fibroblastos (FSL1) y anticuerpos anti-CD40.

35 Las composiciones de la invención pueden ser formulaciones líquidas, incluyendo, sin limitarse a, suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires, acuosos u oleosos. Las composiciones también pueden formularse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos, incluyendo, entre otros, agentes de suspensión, emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Como agentes de suspensión se incluyen, sin limitación, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes incluyen, pero no se limitan a, lecitina, monooleato de sorbitano y acacia. Los
40 conservantes incluyen, pero no se limitan a, p-hidroxibenzoato de metilo o de propilo y ácido sórbico. Los agentes dispersantes o humectantes incluyen, entre otros, poli(etilenglicol), glicerol, seroalbúmina bovina, Tween®, Span®.

Las composiciones de la invención también pueden formularse como una preparación en depósito que puede administrarse por implantación o vía inyección intramuscular.

45 Las composiciones sólidas de esta invención pueden estar en forma de tabletas o pastillas formuladas de forma convencional. Por ejemplo, las tabletas y cápsulas para la administración oral pueden contener excipientes convencionales, incluyendo, entre otros, aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes y humectantes. Los aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas incluyen, pero no se limitan a, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato de almidón-sodio. Los agentes humectantes
50 incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Los compuestos de esta invención también pueden administrarse en formas de liberación sostenida o de sistemas de administración de medicamentos de liberación sostenida.

De acuerdo con una realización particular, las composiciones de acuerdo con la invención son para su uso subcutáneo.

En otro aspecto particular, las composiciones de acuerdo con la invención están adaptadas para su suministro por administración repetida.

Otros materiales, así como técnicas de procesamiento de formulaciones se indican en la Parte 5 de Remington "The Science and Practice of Pharmacy", 22ª edición, 2012, Universidad de Ciencias de Filadelfia, Lippincott Williams & Wilkins.

5 Otro aspecto de la descripción es describir un método para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la invención que comprende el paso de mezclar un péptido de penetración celular o un complejo de acuerdo con la invención o células, en particular células presentadoras de antígeno, cargadas con un complejo de acuerdo con la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 El complejo según la invención, las células, en particular células presentadoras de antígeno, cargadas con un complejo según la invención, las composiciones de acuerdo con la invención, sus formulaciones o un método de acuerdo con la descripción son útiles en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, en particular aquellos que pueden tratarse o prevenirse con inmunoterapia, como cánceres y enfermedades infecciosas.

15 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de diagnóstico por imágenes. Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a métodos para suministrar un agente de formación de imágenes y métodos para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un sujeto, preferiblemente un sujeto mamífero, y más preferiblemente un paciente humano, que se sospecha que padece un trastorno médico, y en particular un cáncer, una enfermedad infecciosa, un trastorno autoinmune y un rechazo a trasplante.

Las formulaciones y modos de administración descritos aquí de las composiciones farmacéuticas también pueden ser adecuados para las composiciones de diagnóstico por imagen de acuerdo con la invención.

20 En un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a un kit de partes que comprende al menos uno de:

- (a) un péptido de penetración celular de acuerdo con la invención;
- (b) un complejo de acuerdo con la invención;
- (c) un ácido nucleico de acuerdo con la invención;
- (d) un vector de acuerdo con la invención;
- 25 (e) una célula huésped según la invención;
- (f) una celda cargada con un complejo de acuerdo con la invención.

En una realización particular, el kit de partes como se describe aquí comprende más de un componente según (a) a (f).

30 En una ilustración de la descripción, el kit de partes comprende al menos dos péptidos diferentes según (a), al menos dos complejos diferentes según (b), al menos dos ácidos nucleicos diferentes según (c), al menos dos vectores diferentes según (d), al menos dos células huésped diferentes según (e) y/o al menos dos células diferentes según (f).

En otra ilustración, el kit de partes como se describe aquí comprende al menos dos complejos diferentes y/o al menos dos ácidos nucleicos diferentes de acuerdo con la invención.

35 En particular, el kit de partes como se describe aquí puede comprender más de un complejo de acuerdo con la invención, por ejemplo, al menos dos complejos donde cada complejo comprende una o más moléculas de carga y donde dichas moléculas de carga son diferentes entre los complejos.

En una ilustración, el kit de partes como se describe aquí comprende al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende uno o más epítopos y donde dichos epítopos son diferentes entre los complejos.

40 En otra ilustración, el kit de partes como se describe aquí comprende al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más epítopos y donde dichos ácidos nucleicos son diferentes entre los complejos. Los diversos componentes del kit de partes se pueden empaquetar en uno o más recipientes. Los componentes anteriores pueden proporcionarse en forma liofilizada o seca o disueltos en un tampón adecuado. El kit también puede comprender reactivos adicionales, incluyendo, por ejemplo, conservantes, medios de crecimiento y/o tampones para el almacenamiento y/o la reconstitución de los componentes mencionados anteriormente, y soluciones de lavado. En otra realización, el kit de partes como se describe aquí también contiene instrucciones de uso.

45 Otro aspecto de la descripción es un kit de vacunación para tratar, prevenir o estabilizar un cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con la invención e instrucciones para el uso de dicha composición farmacéutica. En una realización particular de la descripción, las composiciones según la invención y/o el kit de partes como se describe aquí son para uso en técnicas de formación de imágenes. En otra realización, las composiciones según la invención y/o el kit de partes como se describe aquí son para uso en el diagnóstico de una enfermedad o trastorno como se menciona a lo largo de la presente solicitud.

50

Uso y métodos

Un aspecto de la descripción describe un método para suministrar una molécula de carga a una célula *in vitro*, comprendiendo la etapa de disponer dicha célula en contacto con un péptido de penetración celular de acuerdo con la invención y dicha molécula de carga.

5 En un aspecto particular, el método como se describe aquí para suministrar una molécula de carga a una célula *in vitro* comprende los pasos de:

- a) formar un complejo entre un péptido de penetración celular de acuerdo con la invención y la molécula de carga a ser administrada a una célula, y
- b) poner dicha célula en contacto con el complejo formado en el paso a).

10 Otro aspecto de la descripción describe un método *in vitro* para administrar y presentar los epítomos de una molécula de carga en la superficie de una célula en un contexto MHC de clase I y/o de clase II, que comprende el paso de poner dicha célula en contacto con un péptido de penetración celular según la invención y dicha molécula de carga.

15 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de uno cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con un complejo de la invención, para la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o la estabilización de una enfermedad o trastorno, tal como aquel que puede tratarse por inmunoterapia, incluyendo cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes y rechazos a trasplantes.

20 En una realización ventajosa de la invención, se proporciona un complejo de acuerdo con la invención que comprende un péptido de penetración celular y epítomos, permitiendo el transporte y la presentación de dichos epítomos en la superficie celular de células presentadoras de antígenos en un contexto de MHC de clase I y/o MHC de clase II para su uso en vacunación y/o en la inmunoterapia. De acuerdo con otro aspecto, la descripción describe un método para prevenir, tratar o reprimir una enfermedad o trastorno, tal como aquel que puede tratarse por inmunoterapia, incluyendo cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes y rechazos a trasplantes, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con un complejo de la invención, o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto.

25 De acuerdo con otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para provocar o mejorar en un sujeto una respuesta inmune contra uno o múltiples epítomos que son dependientes de células T auxiliares CD4⁺ y/o células T citotóxicas CD8⁺, donde dicho método comprende administrar uno cualquiera de: (i) un complejo de la invención que comprende una molécula de carga que contiene uno o varios epítomos, (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con dicho complejo, o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto.

30 Una respuesta inmunitaria que depende de la respuesta de CD4⁺ y/o CD8⁺ se puede determinar evaluando una respuesta inflamatoria, una respuesta de citoquinas proinflamatoria, incluyendo un aumento de la expresión de uno o más ARNm de IFN- γ , TNF- α e IL-2 o de una proteína en relación al nivel antes de la administración de los compuestos de la invención. También puede medirse por un aumento en la frecuencia o el número absoluto de células T específicas de antígeno después de la administración de los compuestos de la invención, medido por tinción con multímero de péptido HLA, ensayos ELESPT y pruebas de hipersensibilidad de tipo retardado. También puede medirse indirectamente por un aumento en los anticuerpos séricos específicos de antígeno que dependen de las células T auxiliares específicas de antígeno. De acuerdo con otra realización, la descripción describe un método para provocar o mejorar en un sujeto una respuesta inmune contra uno o múltiples epítomos que está restringida por múltiples moléculas MHC de clase I y/o múltiples moléculas MHC de clase II, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo de la invención que comprende una molécula de carga que contiene uno o varios epítomos, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con dicho complejo o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto.

35 Un método para provocar o mejorar en un sujeto una respuesta inmunitaria contra múltiples epítomos que está restringida por múltiples moléculas MHC de clase I y/o múltiples moléculas MHC de clase II puede determinarse evaluando una respuesta de citoquina, incluyendo un aumento de la expresión de uno o más de ARNm o proteínas de IFN- γ , TNF- α e IL-2 en relación con el nivel antes de la administración de los compuestos de la invención, después de la estimulación *in vitro* de células T con péptidos individuales que se unen a moléculas discretas de MHC de clase I y clase II en células presentadoras de antígeno. La restricción a diferentes moléculas de MHC también se puede validar mediante el uso de células presentadoras de antígeno que expresan diferentes moléculas de MHC o mediante el uso de anticuerpos bloqueadores de MHC. También puede medirse por un aumento de la frecuencia o el número absoluto de células T específicas de antígeno después de la administración de los compuestos de la invención, medida por tinción con multímero HLA-péptido, que utiliza multímeros ensamblados con moléculas MHC discretas.

40 En un aspecto preferente de los métodos para provocar o mejorar una respuesta inmune contra uno o múltiples epítomos según la invención, la respuesta inmune se dirige contra uno o múltiples epítomos de un antígeno asociado a tumor o un

antígeno específico de tumor, por ejemplo una combinación de epítomos de glioma como los descritos en Novellino et al. (2005, Cancer Immunol Immunother, 54(3): 187-207) y Vigneron et al. (2013, Cancer Immun.13:15).

En otro aspecto preferente, la respuesta inmune se dirige contra múltiples epítomos de una proteína antigénica de un patógeno.

- 5 En un aspecto particular de los métodos de acuerdo con la descripción, dichos métodos son para provocar o mejorar en un sujeto una respuesta inmune contra uno o múltiples epítomos que están restringidos por moléculas de clase I de MHC y/o moléculas de clase II de MHC.

- 10 En otro aspecto, la descripción describe el uso de uno cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con el complejo de la invención, para la preparación de una composición de formación de imágenes para técnicas de imagen o para la preparación de una composición de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad o trastorno, respectivamente. Las enfermedades o trastornos que pueden ser diagnosticados con la descripción incluyen aquellos que pueden tratarse por inmunoterapia, por ejemplo cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes y rechazos a trasplantes.

- 15 De acuerdo con otro aspecto, la descripción describe un método de obtención de imágenes que comprende usar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con el complejo de la invención o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii).

- 20 De acuerdo con un aspecto adicional, la descripción describe un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un sujeto, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con el complejo de la invención o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto o a dicha muestra del sujeto *ex vivo*.

En una realización particular, los usos y métodos de la descripción que comprende la invención incluyen administrar un complejo de acuerdo con la invención.

En otra realización particular, los usos y métodos de la descripción que comprende la invención incluyen la administración de más de un complejo, células o formulación farmacéutica de acuerdo con la invención.

- 25 En una ilustración de los usos y métodos de la descripción que comprende la invención, se usan o administran al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende una o más moléculas de carga y dichas moléculas de carga son diferentes entre los complejos. En otra ilustración de los usos y métodos de la descripción que comprende la invención, se usan o administran al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende uno o más epítomos y donde dichos epítomos son diferentes entre los complejos.

- 30 En una ilustración adicional de los usos y métodos de la descripción que comprende la invención, se usan o administran al menos 2 complejos, donde cada complejo comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más epítomos y donde dichos ácidos nucleicos son diferentes entre los complejos.

- 35 Ejemplos de cánceres para los usos y métodos de la descripción que comprende la invención incluyen cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanoma, carcinoma intestinal, carcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, leucemia mieloide crónica, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma endometrial, leucemia mieloide, carcinoma de células escamosas de pulmón, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, tumor vesical, leucemia promielocítica, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, sarcoma.

El cáncer puede ser un tumor sólido, cáncer sanguíneo o cáncer linfático. El cáncer puede ser benigno o metastásico.

- 40 Ejemplos de enfermedades infecciosas para los usos y métodos de la descripción que comprende la invención incluyen enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares. Éstos incluyen, por ejemplo, amebiasis, ántrax, úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*), diarrea asociada a calicivirus, diarrea por campylobacter, cáncer cervical (virus del papiloma humano), chlamydia trachomatis asociada a enfermedades genitales, cólera, fiebre hemorrágica del Congo-Crimea, fiebre del dengue, difteria, fiebre hemorrágica del ébola, diarrea enterotoxigénica por *Escherichia coli* (ETEC), cáncer gástrico (*Helicobacter pylori*), gonorrea, enfermedades asociadas a estreptococos del grupo A, enfermedad asociada a estreptococos del grupo B, neumonía por *Haemophilus influenzae* B y enfermedad invasiva, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, E, diarrea por hepatitis E, úlceras genitales por virus del herpes simple tipo 2, VIH/SIDA, anquilostomiasis, influenza, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, leishmaniosis, leptospirosis, cáncer de hígado (hepatitis B), cáncer de hígado (hepatitis C), enfermedad de Lyme, malaria, Fiebre hemorrágica de Marburg, sarampión, paperas, cáncer nasofaríngeo (virus de Epstein-Barr), meningitis por *Neisseria meningitidis*, parainfluenza asociada a neumonía, tos ferina, peste, poliomielitis, rabia, virus sincitial respiratorio (VSR), fiebre del Valle del Rift, diarrea por rotavirus, rubéola, esquistosomiasis, síndrome respiratorio agudo severo (SVE), shigelosis, viruela, enfermedades

asociadas a *Estafilococos aureus*, cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), *Streptococcus pneumoniae* y enfermedad invasiva, tétanos, encefalitis transmitida por garrapatas, tracoma, tuberculosis, tularaemia, fiebre tifoidea, enfermedad asociada al virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla.

5 En otra realización del uso y el método de la descripción que comprende la invención, las células de acuerdo con la invención son células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, más particularmente células dendríticas del sujeto a tratar.

Típicamente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con la invención es de aproximadamente 0,1 mg a 2 mg por inyección o de aproximadamente 1 μ mol a 1 mmol por inyección.

10 Típicamente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente eficaz de una célula presentadora de antígeno cargada con un polipéptido de acuerdo con la invención es de aproximadamente 0,2 millones de células a 2 millones de células por inyección.

La dosis administrada a un individuo, como dosis únicas o múltiples, variará dependiendo de diversos factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

15 **Modo de administración**

Los compuestos, las composiciones, en particular las composiciones de vacunas, y las formulaciones de los mismos de acuerdo con esta invención pueden administrarse de cualquier forma, incluyendo la vía oral, parenteral, intravenosa, rectal o combinaciones de las mismas. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica e intramuscular. Las composiciones de esta invención también pueden administrarse vía tópica, intratumoral, intranasal o intranodal. Las composiciones de esta invención también pueden administrarse en forma de un implante, lo que permite una liberación lenta de las composiciones, así como por infusión iv lenta controlada.

Preferentemente, los compuestos, las composiciones, en particular las composiciones de vacunas, y sus formulaciones de acuerdo con la invención se administran vía subcutánea.

25 En una realización de la invención, la administración del complejo, de las células presentadoras de antígeno y de las composiciones de la invención requiere múltiples inyecciones sucesivas. Así, la administración se puede repetir al menos dos veces, una vez como inyecciones de inmunización primaria y, más tarde, como inyecciones de refuerzo.

30 En una realización particular de la invención, la composición de vacuna puede administrarse repetida o continuamente. La composición de la vacuna se puede administrar de forma repetida o continua durante un período de al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 12 meses; o 2, 3, 4 o 5 años.

En otra realización, el péptido de penetración celular y la molécula de carga que componen el complejo de acuerdo con la invención están contenidas en composiciones separadas que se mezclan justo antes de la administración o que se administran simultáneamente al sujeto que lo necesita.

Combinación

35 De acuerdo con una realización adicional, la administración de las composiciones farmacéuticas en los métodos y usos de acuerdo con la descripción que comprende la invención puede llevarse a cabo sola o en combinación con un co-agente útil para tratar y/o estabilizar la enfermedad o trastorno a tratar o reprimir.

40 Por ejemplo, en el caso del tratamiento, la prevención o la estabilización de un cáncer, la administración de las composiciones farmacéuticas en los métodos y usos de acuerdo con la descripción que comprende la invención puede llevarse a cabo en combinación con sustancias usadas en la quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para el control del establecimiento de metástasis o con cualquier otra molécula que actúe activando la muerte celular programada, por ejemplo un co-agente seleccionado entre los miembros de la familia de la necrosis tumoral, incluyendo, entre otros, el ligando Fas y el ligando inductor de apoptosis (TRAIL) relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF). De acuerdo con una realización adicional, la administración de las composiciones farmacéuticas en los métodos y usos de acuerdo con la descripción que comprende la invención se puede llevar a cabo en paralelo con la radioterapia.

50 La invención abarca la administración de un complejo de la invención, de una célula cargada con el complejo de la invención o de una composición farmacéutica de los mismos de acuerdo con la invención, donde se administra a un sujeto antes, simultánea o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o co -agentes útiles para tratar y/o estabilizar un cáncer y/o prevenir la recaída del cáncer (por ejemplo, múltiples regímenes farmacológicos), en una cantidad terapéuticamente eficaz. Dicho complejo, célula o composición farmacéutica, que se administra simultáneamente con

dichos coagentes, puede administrarse en la misma o en diferentes composiciones y por la misma o diferente(s) vía(s) de administración.

5 Dichos otros regímenes terapéuticos o co-agentes pueden seleccionarse del grupo consistente en radioterapia, quimioterapia, cirugía, terapia dirigida (incluyendo moléculas pequeñas, péptidos y anticuerpos monoclonales) y terapia antiangiogénica. La terapia antiangiogénica se define aquí como la administración de un agente que se dirige directa o indirectamente a la vasculatura asociada con el tumor.

10 De acuerdo con una realización, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un complejo de la invención o una célula de la invención, en particular una célula presentadora de antígeno de la invención, combinada con al menos un co-agente útil para tratar y/o estabilizar un cáncer y/o para la prevención de una recaída del cáncer y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otra realización de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención y sus formulaciones farmacéuticas pueden administrarse después de una cirugía en la que se han eliminado tumores sólidos como profilaxis contra recaídas y/o metástasis.

15 De acuerdo con una realización adicional, la administración de la composición de diagnóstico o diagnóstico por imagen en los métodos y usos de acuerdo con la descripción que comprende la invención puede llevarse a cabo sola o en combinación con un co-agente útil para formar imágenes y/o para diagnosticar la enfermedad o trastorno sospechados.

Pacientes

20 Dependiendo del efecto terapéutico de la molécula de carga, la invención puede aplicarse a cualquier paciente susceptible de padecer o que padece cualquier enfermedad o trastorno que pueda prevenirse, tratarse o reducirse por la acción de dicha molécula de carga. Cuando la molécula de carga comprende epítomos, el efecto terapéutico de dicha molécula de carga puede ser provocar una respuesta inmune dirigida contra dichos epítomos, en particular una respuesta que es dependiente de las células T auxiliares CD4⁺ y/o de las células T citotóxicas CD8⁺ y/o que está restringida por moléculas MHC de clase I y/o moléculas MHC de clase II.

25 En una realización, los pacientes según la invención son pacientes susceptibles de padecer o que padecen un cáncer, por ejemplo cáncer de cerebro, colon, cabeza o cuello o cáncer cervical.

En una realización particular, los pacientes de acuerdo con la invención son pacientes que padecen cáncer de cerebro, incluyendo glioma.

En una realización particular, los pacientes según la invención han sido sometidos a una extirpación quirúrgica de un tumor.

30 En otra realización, los pacientes según la invención son pacientes susceptibles de padecer o que padecen una enfermedad infecciosa.

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos se han realizado para respaldar la efectividad de algunos fragmentos de ZEBRA como péptidos de penetración celular para el suministro de péptidos y proteínas a la célula y la inducción de una respuesta inmune *in vivo*.

Las siguientes abreviaturas se refieren respectivamente a las siguientes definiciones: aa (aminoácido), h (hora), µl (microlitro), µM (micromolar), mM (milimolar), mg (miligramo), min (minuto), CFSE (succinimidil éster de carboxifluoresceína), DC (células dendríticas).

40 **Ejemplo 1: Preparación de polipéptidos de fusión que contienen CPP1 o CPP2 de la presente invención y una carga peptídica de ovoalbúmina**

Se sintetizaron químicamente dos CPP y dos polipéptidos de fusión correspondientes a los constructos 1 y 2, que comprendían, respectivamente, uno de los dos CPP derivados de ZEBRA y el epítipo inmunodominante de células T CD8⁺ de ovoalbúmina. La secuencia de aminoácidos de estos CPP y polipéptidos de fusión era la siguiente:

45 CPP1: (17 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 1: KRYKNRVASRKSRAKFK

CPP2: (30 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 2: KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAK

Epítipo CD8 de ovoalbúmina (8 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 3: SIINFEKL

Complejo 1: Constructo 1: comprendiendo CPP1 fusionado a epítipo CD8 de ovoalbúmina (33 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 4: KRYKNRVASRKSRAKFKEQLESIIINFEKLEWT

- 5 Complejo 2: Constructo 2: comprendiendo CPP2 fusionado a epítipo CD8 de ovoalbúmina (46 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 5: KRYKNRVASRKSRAKFQLLQHYREVAAAKEQLESIIINFEKLEWT

Ejemplo 2: Suministro y presentación restringida de MHC clase I después de la carga de polipéptidos de fusión CPP1-OVA o CPP2-OVA de acuerdo con la invención en células dendríticas

10 La capacidad de la CPP1 y la CPP2 para ser captada por las células presentadoras de antígeno, con el procesamiento y la presentación del epítipo de ovoalbúmina, se ensayó por primera vez *in vitro*. Cada uno de los constructos 1 y 2 se añadió a cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea, que posteriormente maduraron durante la noche con lipopolisacárido (LPS). El procesamiento y la presentación del epítipo de ovoalbúmina en moléculas MHC de clase I se detectaron luego en un ensayo funcional, mediante el co-cultivo de células dendríticas con células T CD8⁺ específicas de ovoalbúmina derivadas de bazo de ratones transgénicos OT1. Las células T OT1 CD8⁺ se marcaron previamente con el colorante fluorescente CFSE, que sirve como indicador de la proliferación específica de antígeno, ya que se diluye con cada división celular. Después de 5 días de co-incubación de células T CD8 OT1 y células dendríticas cargadas con cada uno de los constructos 1 y 2, se evaluó la proliferación mediante citometría de flujo (Figura 1).

20 Los polipéptidos correspondientes a los constructos 1 y 2 fueron capaces de inducir una proliferación comparable de células T OT1 (el 93-96% de las células T habían proliferado, con respecto a la dilución de CFSE). Además, la viabilidad de las células en los cultivos también era similar (69-75%). Esta proliferación fue similar y la viabilidad fue superior a los cultivos de control positivo en los que se agregó el péptido sintético correspondiente al epítipo mínimo de células T (SIINFEKL) (Figuras 1C, 1D). La proliferación también fue específica de ovoalbúmina, ya que se detectaron pocas células T OT1 viables después del cultivo solo o se cultivaron conjuntamente con células dendríticas sin antígeno (Figuras 1A, 1B).

25 **Ejemplo 3: Vacunación de ratones con polipéptidos de fusión CPP1-OVA O CPP2-OVA de la presente invención**

30 Para probar la capacidad de los polipéptidos correspondientes a los constructos 1 y 2 de estimular las células T CD8⁺ específicas del antígeno en condiciones más rigurosas, se analizaron *in vivo* en un protocolo de vacunación (Figura 2). Para obtener una respuesta *in vivo*, la vacuna polipeptídica debe ser absorbida por las células presentadoras de antígeno presentes de forma natural en el animal inyectado y la estimulación de las células T policlonales debe ser altamente eficiente si se detectan células T específicas de ovoalbúmina *ex vivo*. La lectura de estos experimentos fue citometría de flujo de esplenocitos, utilizando multímeros de péptidos MHC para detectar células T CD8⁺ específicas de ovoalbúmina.

35 Después de solo 2 vacunaciones, se detectó una proporción elevada de células T CD8⁺ específicas de ovoalbúmina para los dos grupos de vacunación (0,37-1,14%) de células T CD8⁺ eran multímero positivas, en comparación con el 0,18% de los ratones vacunados con PBS (control negativo)). El péptido correspondiente al constructo 2 era particularmente eficaz *in vivo*, ya que produjo más del 1% de células T CD8⁺ específicas de ovoalbúmina.

40 Conclusión: En general, estos datos confirman la funcionalidad de los CPP 1 y 2 como péptidos de penetración celular. También confirman que los polipéptidos correspondientes a los constructos 1 y 2, que comprenden cada uno de ellos dos CPP, respectivamente, y un epítipo de células T de ovoalbúmina, pueden ser captados por células dendríticas, y que la molécula de carga (es decir, el epítipo de células T contenido en el constructo) se presenta de forma cruzada a las células T CD8⁺ *in vitro* y en el contexto de la vacunación *in vivo*.

Ejemplo 4: Experimento de transducción *in vitro* con diferentes polipéptidos de fusión CPP-OVA de la invención

45 La transducción en células se controló utilizando diferentes polipéptidos de fusión CPP-OVA que comprenden CPP1, CPP2, CPP8 o CPP10. Cada uno de estos CPP fusionados con el epítipo de células T CD8⁺ inmunodominante de ovoalbúmina se sintetizaron químicamente y se marcaron con fluoresceína. Se incubaron 5 · 10⁵ células durante 2 horas a 37°C con 0,9 μM de los diferentes polipéptidos de fusión. Las células analizadas eran células linfoides humanas K562, células linfoides murinas EL4, células de astrocitoma humano U251 y células de astrocitoma murino GL261. Las células se lavaron en un tampón ácido para eliminar todo el péptido unido a la membrana y se tiñeron para determinar la viabilidad con amarillo Live-Dead. El análisis se realizó por citometría de flujo. El índice de fluorescencia indica el nivel de fluorescencia por encima de la autofluorescencia natural de las células. Es la relación entre el índice de fluorescencia promedio medido por citometría de flujo entre las células solas y las células cargadas con polipéptidos de fusión CPP-OVA.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

	K562	EL4	U251	GL261
CPP1 (SEQ ID NO: 1)	3	4,8	4,5	2,4
CPP2 (SEQ ID NO: 2)	15	57,7	25,1	20,8
CPP8 (SEQ ID NO: 8)	1,9	2,5	2	1,4
CPP10 (SEQ ID NO: 9)	3,7	4	4	1,9

En general, no se observó ningún efecto tóxico de los polipéptidos de fusión CPP-OVA. Además, estos resultados demuestran que todos los CPP probados pueden penetrar en las células de origen humano o murino con una eficacia similar.

5 Ejemplo 5: Vacunación *in vivo* de ratones con diferentes polipéptidos de fusión CPP-OVA de la invención

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 3.

Se vacunaron de cuatro a ocho ratones por grupo dos veces al día vía subcutánea en 14 días de intervalo con 10 nmol de polipéptidos de fusión que comprenden uno de los CPP indicados en la Tabla 2 fusionados al epítipo de ovoalbúmina CD8⁺ (SEQ ID NO: 3) flanqueados por los espaciadores de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 en la parte N-terminal y C-terminal del epítipo CD8⁺, respectivamente. Cada polipéptido de fusión CPP-OVA se inyectó en PBS con 100 µg de anti-CD40. Se inyectaron 50 µg de poli-IC vía intramuscular 7 días después de la segunda vacunación. La respuesta inmune se controló en la sangre con una tinción de pentámero, seguida de análisis de citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 como el número de veces que aumenta con respecto a un polipéptido de fusión de CPP-OVA de referencia que comprende CPP14, de la SEQ ID NO: 22. Como puede observarse en la Tabla 2, todos los polipéptidos de fusión CPP-OVA ensayados tienen un potencial inmunogénico más alto en comparación con el polipéptido de fusión de referencia que comprende CPP14, excepto otro polipéptido de fusión de referencia que comprende CPP7, de SEQ ID NO: 21, que constituye un control negativo y que tenía un potencial inmunogénico más bajo en comparación con el polipéptido de fusión de referencia que comprende CPP14.

Tabla 3

Polipéptido de fusión CPP-OVA donde CPP es	Veces que se incrementa la proliferación comparado con CPP14
CPP7 (SEQ ID NO: 21)	0,65
CPP1 (SEQ ID NO: 1)	1,74
CPP2 (SEQ ID NO: 2)	1,41
CPP8 (SEQ ID NO: 8)	1,28
CPP10 (SEQ ID NO: 9)	2,17

CPP7 es un fragmento de 8 aminoácidos de longitud de Zebra que se extiende desde las posiciones 178 a 185 de Zebra.

CPP 14 es un fragmento de Zebra de 42 aminoácidos de longitud que se extiende desde las posiciones 178 a 219 de Zebra.

Conclusión: En conjunto, los resultados de los Ejemplos 4 y 5 muestran que los diferentes CPP de la invención pueden penetrar en células de origen humano o murino y que la molécula de carga transportada por dichos CPP se presenta de forma cruzada a las células T CD8⁺, es decir, induce una respuesta inmunitaria específica para la molécula de carga transportada y, por tanto, tiene utilidad en la vacunación y la inmunoterapia.

Listado de secuencias

CPP1: (17 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 1: KRYKNRVASRKSRAKFK

30 CPP2: (30 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 2: KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAK

Epítipo ovoalbúmina CD8 (8 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 3: SIINFEKL

35 Polipéptidos de fusión CPP-OVA:
Construcciones 1: comprendiendo CPP1 fusionado a epítipo de ovoalbúmina CD8 (33 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 4: KRYKNRVASRKSRAKFKQLESIINFEKLTEWT

Construcciones 2: comprendiendo CPP2 fusionado a epítipo de ovoalbúmina CD8 (46 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 5: KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKEQLESIINFEKLTEWT

Secuencia artificial

SEQ ID NO: 6: X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁SX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇

- X₁ es K, R, o H
- X₂ es R, K, o H
- 5 X₃ es Y, W, o F
- X₄ es K, R, o H
- X₅ es N o Q
- X₆ es R, K, o H
- X₇ es V, I, M, L, F, o A
- 10 X₈ es A, V, L, I, o G
- X₉ es S o T
- X₁₀ es R, K, o H
- X₁₁ es K, R, o H
- X₁₃ es R, K, o H
- 15 X₁₄ es A, V, L, I, o G
- X₁₅ es K, R, o H
- X₁₆ es F, L, V, I, Y, W, o M
- X₁₇ es K, R, o H

Secuencia artificial

20 SEQ ID NO: 7: X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁SX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇

- X₁ es K o R
- X₂ es R o K
- X₃ es Y, W, o F
- X₄ es K o R
- 25 X₅ es N o Q
- X₆ es R o K
- X₇ es V, I, M o L
- X₈ es A o G
- X₉ es S o T
- 30 X₁₀ es R o K
- X₁₁ es K o R
- X₁₃ es R o K
- X₁₄ es A o G
- X₁₃ es K o R
- 35 X₁₆ es F, Y, o W
- X₁₇ es K o R

CPP8: (15 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 8: QHYREVAAAKSSEND

40 CPP10: (19 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 9: REVAAAKSENDRRLRLLLK

CPP11: (25 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 10: QLLQHYREVAAAKSENDRRLRLLLK

Espaciadores (secuencias artificiales)

45 SEQ ID NO: 11: EQLE
SEQ ID NO: 12: TEWT

Secuencia artificial (21 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 13: LEIKRYKNRVASRKCRKFKQ

Secuencia artificial (21 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 14: SELEIKRYKNRVASRKCRKCF

50 Sitio diana de enteroquinasa
SEQ ID NO: 15: DDDK

Sitio diana de Factor Xa
SEQ ID NO: 16: IEDGR

Sitio diana de trombina
SEQ ID NO: 17: LVPRGS

Sitio diana proteasa TEV
SEQ ID NO: 18: ENLYFQG

- 5 Sitio diana proteasa pre-escisión
SEQ ID NO: 19: LEVLFQGP

Sitio diana de Furina
SEQ ID NO: 20: RX₂X₃R
X₂ es cualquier aminoácido

- 10 X₃ es R o K
CPP7 (8 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 21: KRYKNRVA

CPP14 (42 aminoácidos en total)
SEQ ID NO: 22: KRYKNRVASRKCRKAKFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLK Secuencia aminoácidos **ZEBRA**
(secuencia natural del virus Epstein - Barr (EBV)) (YP_401673)

- 15 SEQ ID NO: 23:
MMDPNSTSEDVKFTPDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLP
EPLPQGQLTAYHVSTAPTGSWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQNQQTN
QAGGEAPQPGDNSTVQTAAAVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAPARRT
RKPQQPESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCRKAKFKQLLQHYREVAAAKSEND
RLRLLLKQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF

LESTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Ginebra

Les Hôpitaux Universitaires de Genève

<120> Nuevos péptidos de penetración celular

5 <130> P1584PC00

<150> US 61/700,432

<151> 2012-09-13

<150> EP 12184311.4

<151> 2012-09-13

10 <160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CCP1

<400> 1

Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
 1 5 10 15

Lys

20 <210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> CPP2

<400> 2

Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys
 20 25 30

<210> 3

<211> 8

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 734 561 T3

<220>

<223> epítipo ovoalbúmina CD8

<400> 3

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

5 <210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> polipéptido de fusión CPP1-OVA

<400> 4

Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
1 5 10 15

Lys Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp
20 25 30

Thr

<210> 5

<211> 46

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión CPP2-OVA

<400> 5

Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Ser Arg Ala Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Glu Gln
20 25 30

20 **Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr**
35 40 45

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Secuencia genérica

<220>

<221> MESC_FEATURE

<222> (1)..(1)

30 <223> Xaa es K, R, o H

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es R, K, o H

5 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Y, W, o F

10 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es K, R, o H

15 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es N o Q

20 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es R, K, o H

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es V, I, M, L, F, o A

25 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es A, V, L, I, o G

30 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es S o T

35 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es R, K, o H

40 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es K, R, o H

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es R, K, o H

45 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es A, V, L, I, o G

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es K, R, o H

5 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es F, L, V, I, Y, W, o M

10 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es K, R, o H

<400> 6
Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

15 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia genérica

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es K o R

25 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es R o K

30 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Y, W, o F

35 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es K o R

40 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es N o Q

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es R o K

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es V, I, M o L

5 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es A o G

10 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es S o T

15 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es R o K

20 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es K o R

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es R o K

25 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es A o G

30 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es K o R

35 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es F, Y, o W

40 <220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es K o R

<400> 7
Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 8
 <211> 15

ES 2 734 561 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CPP8

5 <400> 8
Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp
1 5 10 15

<210> 9
<211> 19
<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CPP10

<400> 9
Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu
1 5 10 15

Leu Leu Lys

15 <210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> CPP11

<400> 10
Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu
1 5 10 15

Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys
20 25

<210> 11
<211> 4
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> espaciador

<400> 11
Glu Gln Leu Glu
30 1

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<400> 16
Ile Glu Asp Gly Arg
 1 5

<210> 17
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sitio diana trombina

<400> 17
Leu Val Pro Arg Gly Ser
 10 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sitio diana proteasa TEV

<400> 18
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 1 5

20 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sitio diana proteasa pre-escisión

25 <400> 19
Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
 1 5

<210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sitio diana furina

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 35 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>
 <221> MESC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 40 <223> Xaa es R o K

<400> 20
Arg Xaa Xaa Arg
 1

5 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CPP6

10 <400> 21
Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala
 1 5

<210> 22
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> CPP14

<400> 22
Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser
 20 25 30

Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys
 35 40

20 <210> 23
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Virus Epstein-Barr

<400> 22
Met Met Asp Pro Asn Ser Thr Ser Glu Asp Val Lys Phe Thr Pro Asp
 1 5 10 15

ES 2 734 561 T3

Pro Tyr Gln Val Pro Phe Val Gln Ala Phe Asp Gln Ala Thr Arg Val
 20 25 30

Tyr Gln Asp Leu Gly Gly Pro Ser Gln Ala Pro Leu Pro Cys Val Leu
 35 40 45

Trp Pro Val Leu Pro Glu Pro Leu Pro Gln Gly Gln Leu Thr Ala Tyr
 50 55 60

His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly Ser Trp Phe Ser Ala Pro Gln Pro
 65 70 75 80

Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Phe Pro
 85 90 95

Val Ser Asp Ile Thr Gln Asn Gln Gln Thr Asn Gln Ala Gly Gly Glu
 100 105 110

Ala Pro Gln Pro Gly Asp Asn Ser Thr Val Gln Thr Ala Ala Ala Val
 115 120 125

Val Phe Ala Cys Pro Gly Ala Asn Gln Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ile
 130 135 140

Gly Val Pro Gln Pro Ala Pro Val Ala Ala Pro Ala Arg Arg Thr Arg
 145 150 155 160

Lys Pro Gln Gln Pro Glu Ser Leu Glu Glu Cys Asp Ser Glu Leu Glu
 165 170 175

Ile Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys
 180 185 190

Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser
 195 200 205

Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Gln Met Cys Pro Ser
 210 215 220

Leu Asp Val Asp Ser Ile Ile Pro Arg Thr Pro Asp Val Leu His Glu
 225 230 235 240

Asp Leu Leu Asn Phe
 245

REIVINDICACIONES

1. Péptido de penetración celular caracterizado porque:
- 5 i) la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido está comprendida entre 15 y 30 aminoácidos en total; y
- ii) dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 al residuo 220 de ZEBRA de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23, donde se han sustituido, eliminado y/o agregado 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sin eliminar la capacidad de penetración celular de dicho péptido;
- 10 iii) con la condición de que la secuencia de dicho péptido de penetración celular no sea una secuencia seleccionada del grupo consistente en:
- Ac-RAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLL-NH₂;
- Ac-AKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL-NH₂;
- Ac-KFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLK-NH₂;
- 15 Ac-FKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKQ-NH₂ y
LEIKRYKNRVASRKCRKFKQ
2. Péptido de penetración celular según la reivindicación 1, donde dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una SER (S) en el equivalente a la posición 189 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA.
3. Péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque dicho péptido
- 20 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende:
- i) la SEQ ID NO: 1 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o
- ii) la SEQ ID NO: 6 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar
- 25 la capacidad de penetración celular de dicho péptido, donde
- X₁ es K, R, o H
- X₂ es R, K, o H
- X₃ es Y, W, o F
- X₄ es K, R, o H
- X₅ es N o Q
- 30 X₆ es R, K, o H
- X₇ es V, I, M, L, F, o A
- X₈ es A, V, L, I, o G
- X₉ es S o T
- X₁₀ es R, K, o H
- 35 X₁₁ es K, R, o H
- X₁₃ es R, K, o H
- X₁₄ es A, V, L, I, o G
- X₁₅ es, K, R, o H
- X₁₆ es F, L, V, I, Y, W, o M
- 40 X₁₇ es K,R, o H, o
- iii) la SEQ ID NO: 7 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido, donde
- 45 X₁ es K o R
- X₂ es R o K
- X₃ es Y, W, o F
- X₄ es K o R
- X₅ es N o Q
- X₆ es R o K
- 50 X₇ es V, I, M o L
- X₈ es A o G
- X₉ es S o T
- X₁₀ es R o K
- X₁₁ es K o R
- 55 X₁₃ es R o K
- X₁₄ es A o G
- X₁₅ es K o R
- X₁₆ es F, Y, o W, y

- 5
 iv) X_{17} es K o R, o
 v) la SEQ ID NO: 8, o
 vi) la SEQ ID NO: 9, o
 vii) la SEQ ID NO: 10, o
 viii) la SEQ ID NO: 1, o
4. Complejo que comprende un péptido de penetración celular y una molécula de carga, donde dicha molécula de carga se selecciona entre epítomos patogénicos y/o epítomos tumorales y el péptido de penetración celular se caracteriza porque:
- 10
 a) la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de penetración celular está comprendida entre 15 y 30 aminoácidos en total; y
 b) dicho péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 al residuo 220 de ZEBRA de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23, donde se han sustituido, eliminado y/o agregado 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sin eliminar la capacidad de penetración celular de dicho péptido.
- 15
5. Complejo según la reivindicación 4, donde el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una Ser (S) en el equivalente de la posición 189 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA.
6. Complejo según la reivindicación 4 o 5, donde el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende:
- 20
 i) la SEQ ID NO: 1 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o
 ii) la SEQ ID NO: 6 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido, donde
- 25
 X_1 es K, R, o H
 X_2 es R, K, o H
 X_3 es Y, W, o F
 X_4 es K, R, o H
 X_5 es N o Q
 X_6 es R, K, o H
 30
 X_7 es V, I, M, L, F, o A
 X_8 es A, V, L, I, o G
 X_9 es S o T
 X_{10} es R, K, o H
 X_{11} es K, R, o H
 35
 X_{13} es R, K, o H
 X_{14} es A, V, L, I, o G
 X_{15} es, K, R, o H
 X_{16} es F, L, V, I, Y, W, o M
 X_{17} es K,R, o H, o
- 40
- iii) la SEQ ID NO: 7 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados sin abortar la capacidad de penetración celular de dicho péptido, donde
- 45
 X_1 es K o R
 X_2 es R o K
 X_3 es Y, W, o F
 X_4 es K o R
 X_5 es N o Q
 X_6 es R o K
 X_7 es V, I, M o L
 50
 X_8 es A o G
 X_9 es S o T
 X_{10} es R o K
 X_{11} es K o R
 X_{13} es R o K
 55
 X_{14} es A o G
 X_{15} es K o R
 X_{16} es F, Y, o W, y
 X_{17} es K o R, o

- iv) la SEQ ID NO: 8, o
v) la SEQ ID NO: 9, o
vi) la SEQ ID NO: 10, o
vii) la SEQ ID NO: 1, o
viii) la SEQ ID NO: 2.
- 5
7. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 - 6, donde dicha molécula de carga se selecciona del grupo consistente en: (i) un péptido, un polipéptido o una proteína, (ii) un polisacárido, (iii) un lípido, (iv) una lipoproteína, (v) un glucolípido, (vi) un ácido nucleico, en particular un ácido nucleico que comprende epítomos de un péptido, polipéptido o una proteína, (vii) un fármaco o toxina de molécula pequeña y (viii) un agente de imagen o de contraste, preferentemente dicha molécula de carga es un péptido, un polipéptido o una proteína.
- 10
8. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 - 7, donde dicho péptido de penetración celular facilita la presentación de epítomo(s) de dicha molécula de carga en la superficie celular en el contexto de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
- 15
9. Polinucleótido que codifica un péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o que codifica un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde la molécula de carga comprendida en el complejo es una molécula de carga de péptido, polipéptido o proteína.
10. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 9.
11. Célula cargada con un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde dicha célula es preferentemente una célula presentadora de antígeno.
- 20
12. Composición que comprende al menos uno de:
- a) un péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
b) un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8;
c) un polinucleótido según la reivindicación 9;
d) un vector según la reivindicación 10;
e) una célula cargada con un complejo según la reivindicación 11.
- 25
13. Composición farmacéutica que comprende:
- a) al menos un péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o al menos un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 o al menos una célula según la reivindicación 11 y
b) un portador farmacéuticamente aceptable,
donde dicha composición preferentemente comprende al menos dos complejos diferentes.
- 30
14. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 para su uso como medicamento, en particular para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos incluyendo cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes o rechazos a trasplantes.
- 35
15. Célula según la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos incluyendo cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes o rechazos a trasplantes.

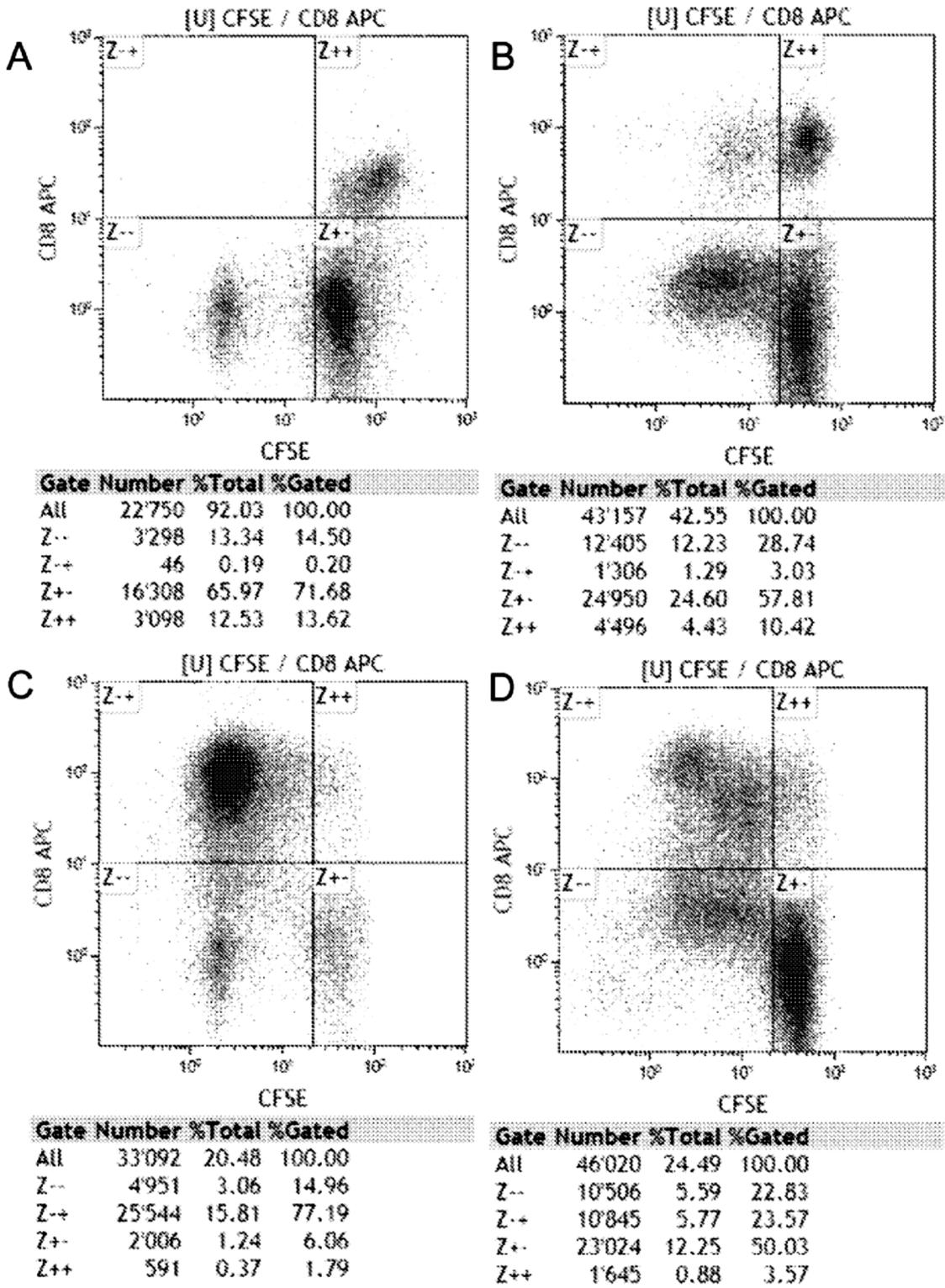


Figura 1

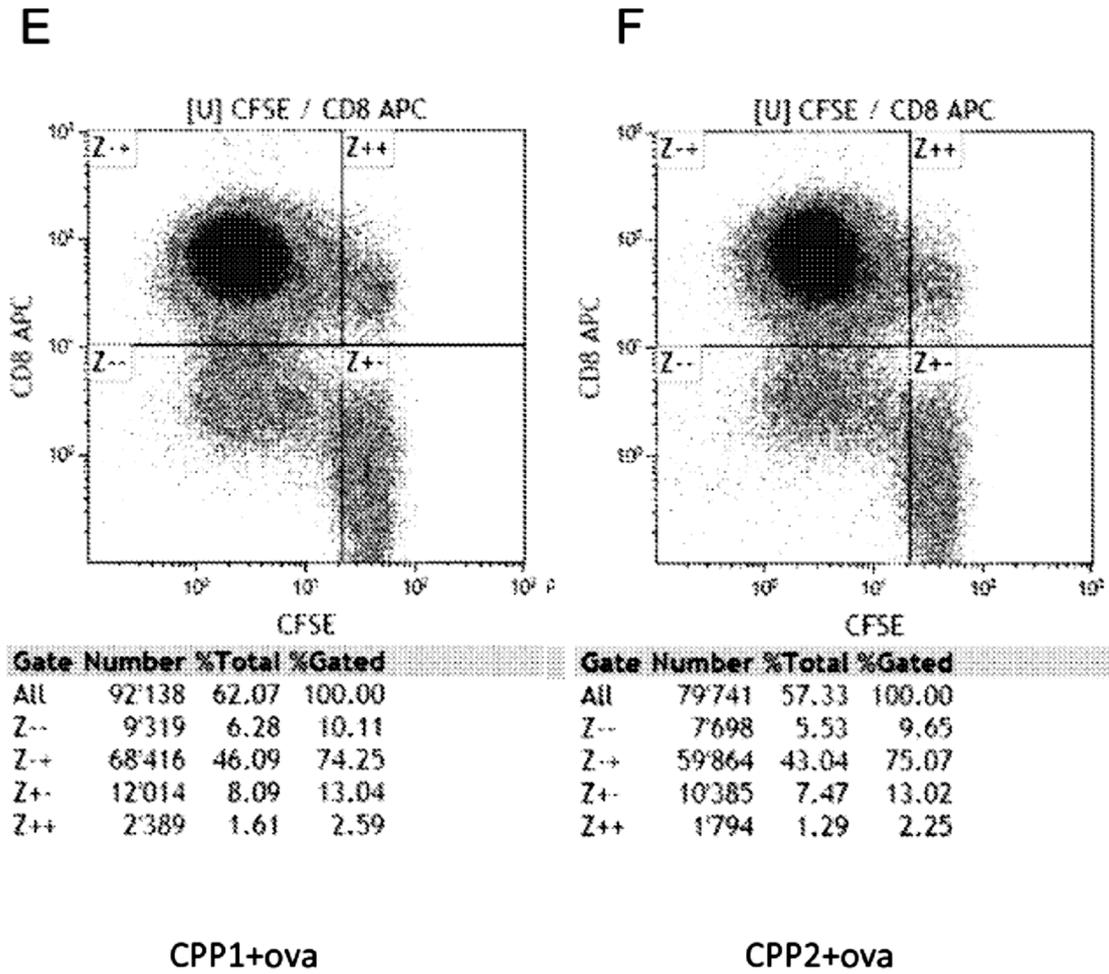


Figura 1 (continuación)

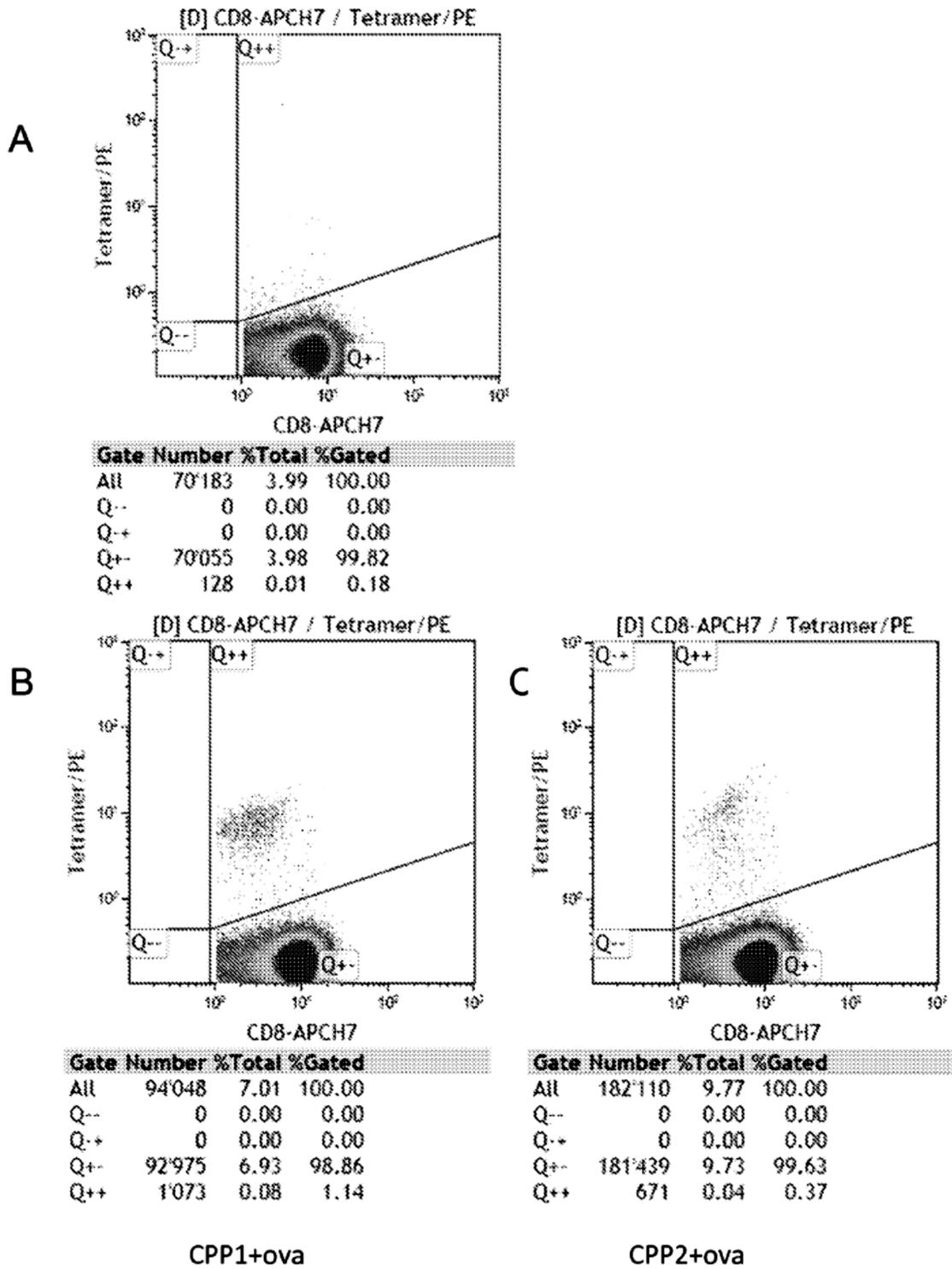


Figura 2