

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 622**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/US2014/066940**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15080980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14865347 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3074034**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad autoinmune y/o inflamatoria usando moduladores de la caveolina novedosos**

30 Prioridad:

26.11.2013 US 201361909005 P

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

20.02.2020

73 Titular/es:

**E & B TECHNOLOGIES LLC (100.0%)
4868 Almondwood Way
San Diego, California 92130, US**

72 Inventor/es:

**EVELETH, DAVID y
SESSA, WILLIAM C.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 743 622 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

Tratamiento de la enfermedad autoinmune y/o inflamatoria usando moduladores de la caveolina novedosos

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/909,005, presentada el 26 de noviembre de 2013.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a composiciones novedosas y métodos para tratar y/o prevenir enfermedades/afecciones autoinmunes y/o inflamatorias usando tales composiciones.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El mecanismo causante de muchas enfermedades es la sobreactividad de una ruta biológica. Un péptido que pueda reducir la actividad de la ruta biológica puede ser eficaz en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad causada por la sobreactividad de la ruta biológica. Similarmente, el mecanismo causante de muchas enfermedades es la sobreproducción de una molécula biológica. Un péptido que pueda reducir la producción de la molécula biológica o bloquear la actividad de la molécula biológica sobreproducida puede ser eficaz en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad causada por la sobreproducción de la molécula biológica.

Por el contrario, el mecanismo causante de muchas enfermedades es la infraactividad de una ruta biológica. Un péptido que pueda aumentar la actividad de la ruta biológica puede ser eficaz en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad causada por la infraactividad de la ruta biológica. Similarmente, el mecanismo causante de muchas enfermedades es la infraproducción de una molécula biológica. Un péptido que pueda aumentar la producción de la molécula biológica o simular la actividad de la molécula biológica infraproducida puede ser eficaz en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad causada por la infraproducción de la molécula biológica.

Las caveolinas son proteínas de unión al colesterol que pueden regular potencialmente una variedad de rutas de transducción de señales (Smart y col., (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 7289-7304; Kurzchalia & Parton, (1999) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11, 424-431). Por ejemplo, numerosos investigadores han demostrado la localización de las proteínas en las cavéolas, la interacción de estas proteínas con las caveolinas y la capacidad de sobreexpresar caveolinas o péptidos derivados de las caveolinas para suprimir o estimular las funciones de señalización *in vitro* o en células cultivadas (Li y col., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 29182-29190; Razani y col., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 26353-26360; Nasu y col., (1998) *Nat. Med.* 4, 1062-1064; García-Cardena y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25437- 25440). Sin embargo, la importancia de las caveolinas como moduladores de la transducción de señales *in vivo* es controvertida, ya que las caveolinas-1 y -3, por sí mismas, son proteínas de unión al colesterol que entregan el colesterol del retículo endoplásmico a la plasmalema, regulando indirectamente de ese modo la transducción de señales modulando el contenido de colesterol de los dominios de balsa lipídica de membrana y las cavéolas (Roy et al., (1999) *Nat. Cell Biol.* 1, 98-105; Sternberg y col., (1999) *Nat. Cell Biol.* 1, E35-37).

Los estudios se han centrado en el tráfico subcelular y la regulación del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El NO derivado de la eNOS es necesario para el mantenimiento de la presión sanguínea sistémica, la remodelación vascular, la angiogénesis y la cicatrización de heridas (Huang y col., (1995) *Nature* 377, 239-242; Murohara y col., (1998) *Clin. Invest.* 101, 2567-0.2578; Rudic y col., (1998) *J. Clin. Invest.* 101, 731-736; Lee y col., (1999) *Am. J. Physiol.* 277, H1600-1608). La eNOS es una proteína de membrana, periférica y doblemente acilada, que se dirige a los dominios de balsa lipídica y las cavéolas (García-Cardena y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6448-6453; Liu y col., (1997) *J. Cell Biol.* 137, 1525-1535). En las cavéolas, la eNOS puede interactuar físicamente con las caveolinas-1 y -3 uniéndose a su dominio putativo de andamiaje localizado entre los aminoácidos 82-101 (Li y col., (1996) *Biol. Chem.* 271, 29182-29190), y está interacción proporciona eNOS en su estado "menos activo" (García-Cardena y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25437- 25440; Ju y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 18522-18525; Michel y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25907-25912). Los datos para este modelo se ilustraron enormemente *in vitro* usando sistemas de sobreexpresión, proteínas de fusión o cribado doble híbrido de levaduras para mapear los dominios interactuantes.

A favor de la caveolina como regulador negativo de la eNOS hay estudios que demuestran que los péptidos derivados del dominio de andamiaje de la caveolina-1 alterarán la unión de la eNOS a la caveolina e inhibirán de forma dependiente de la dosis la actividad de la NOS *in vitro* (CI₅₀ = 1-3 µM) ralentizando el flujo de electrones del dominio reductasa al oxigenasa de la NOS (García-Cardena y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25437-25440; Ju y col., (1997) *J.*

Biol. Chem. 272, 18522-18525; Ghosh y col., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 22267-22271).

El tratamiento de una o más células con un péptido que comprende al menos un dominio de andamiaje de la caveolina ha dado como resultado la reducción y/o eliminación de una o más afecciones o dolencias del tejido, órgano u organismo tratado. Por ejemplo, el tratamiento con un péptido que comprende al menos un dominio de andamiaje de la caveolina ha demostrado reducir o eliminar la inflamación y la angiogénesis y proliferación de células tumorales. (Véase la patente de EE. UU. n.º 8,349,798).

La esclerosis múltiple (EM) y la neuromielitis óptica (NMO) son enfermedades del sistema nervioso central (SNC) que dañan la vaina de mielina que rodea las células nerviosas, lo que conduce a alteraciones visuales, debilidad muscular, pérdida de coordinación, entumecimiento y función mental reducida, entre otros síntomas. A pesar de que las causas de estas enfermedades son inciertas, algunos creen que son trastornos autoinmunes. La uveítis es la inflamación de la úvea, la capa media del ojo, que se sabe que se produce en algunas enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide y la espondilitis anquilosante. Los síntomas pueden incluir dolor ocular, visión borrosa, sensibilidad a la luz y visión reducida. No hay cura conocida para estas enfermedades debilitantes y otros trastornos autoinmunes, el tratamiento es principalmente paliativo y, en muchos casos, mínimamente eficaz a la hora de permitir que los enfermos mantengan una calidad de vida razonable.

Por consiguiente, hay necesidad de nuevas estrategias para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias. La presente invención está dirigida a tal necesidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona un método para tratar una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto que comprende administrar una composición que comprende un péptido transportador aislado que comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO. 1). En realizaciones específicas, la enfermedad o afección inflamatoria es uveítis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, lesión cerebral traumática o enfermedad inflamatoria intestinal.

En algunas realizaciones, el péptido transportador consiste en la SEQ ID NO. 1. En algunas realizaciones, el péptido transportador se une selectivamente a una célula diana o atraviesa una membrana celular. En realizaciones específicas, la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral. En diversas realizaciones, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición comprende un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende un resto de carga enlazado al péptido transportador que comprende la SEQ ID NO. 1. En realizaciones específicas, el resto de carga se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico; un péptido; una proteína; un oligosacárido; un lípido; un glucolípido; una lipoproteína; un compuesto de molécula pequeña; un fármaco terapéutico; un marcador UV-vis, fluorescente o radioactivo; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente profiláctico; un liposoma y un virus.

En diversas realizaciones, el resto de carga se enlaza covalentemente al péptido transportador a través de un grupo enlazador o un enlace químico. En algunas realizaciones, el constructo transportador se une selectivamente a una célula diana o atraviesa una membrana celular. En realizaciones específicas, la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral.

En algunas realizaciones, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6. En realizaciones específicas, el constructo transportador comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 5; SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 1.

En diversas realizaciones, la composición comprende un ácido nucleico que codifica un péptido transportador que comprende la SEQ ID NO: 1. En realizaciones específicas, el ácido nucleico comprende 5'-CGGCGCCCGCCTCGT-3' (SEQ ID NO. 7).

En algunas realizaciones, la composición comprende además un ácido nucleico aislado que codifica al menos un resto de carga. En realizaciones específicas, el resto de carga se selecciona del grupo que consiste en: un péptido; una proteína; un compuesto biológicamente activo; un marcador; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente terapéutico y un agente profiláctico. En algunas realizaciones, el resto de carga se selecciona

del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado codifica el péptido transportador. En realizaciones específicas, la composición comprende además elementos de activación transcripcional que posibilitan la expresión del ácido nucleico que codifica el péptido transportador.

En algunas realizaciones, la composición comprende un ácido nucleico que codifica un resto de carga en el mismo marco que el ácido nucleico que codifica el péptido transportador.

10 En algunas realizaciones, la composición comprende una célula huésped aislada que comprende ácido nucleico exógeno que codifica un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1. En realizaciones específicas, el ácido nucleico es un vector que comprende (a) un ácido nucleico que codifica el péptido transportador y (b) un ácido nucleico que codifica un resto de carga en el mismo marco que el ácido nucleico que codifica el péptido transportador. En diversas realizaciones, la composición comprende además elementos de
15 activación transcripcional.

También se proporcionan en el presente documento métodos para tratar a un sujeto que lo necesita entregando un resto de carga a, o al interior de, una célula diana, comprendiendo el método poner en contacto la célula huésped con un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende un resto de carga y un péptido
20 transportador que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, a través del cual el resto de carga se entrega a, o al interior de, la célula diana. En realizaciones específicas, el resto de carga se enlaza covalentemente al péptido transportador a través de un grupo enlazador o un enlace químico. En algunas realizaciones, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico; un péptido; una proteína; un oligosacárido; un lípido; un glucolípido; una lipoproteína; un compuesto de molécula pequeña; un fármaco terapéutico; un marcador
25 UV-vis, fluorescente o radioactivo; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente profiláctico; un liposoma y un virus. En diversas realizaciones, la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral.

En el presente documento se proporcionan métodos para entregar un resto de carga a, o al interior de, una célula
30 diana de un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende el resto de carga y un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, a través del cual el resto de carga se entrega a, o al interior de, la célula diana del sujeto. En realizaciones específicas, el resto de carga se enlaza covalentemente al péptido
35 transportador a través de un grupo enlazador o un enlace químico. En diversas realizaciones, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico; un péptido; una proteína; un oligosacárido; un lípido; un glucolípido; una lipoproteína; un compuesto de molécula pequeña; un fármaco terapéutico; un marcador UV-vis, fluorescente o radioactivo; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente profiláctico; un liposoma y un virus. En algunas realizaciones, la célula diana comprende una célula endotelial, una
40 célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral.

Como se describe en el presente documento, en diversas realizaciones las composiciones se administran mediante al menos una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, oral, inhalatoria, rectal, oftálmica, pulmonar y tópica. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En realizaciones específicas, el mamífero es un humano.
45 La invención se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** ilustra el enriquecimiento exponencial de fago permeable a células durante los ciclos de purificación por afinidad. Los porcentajes de fago recuperado se representan gráficamente para las seis rondas de purificación por afinidad en células endoteliales. La correlación exponencial se establece con un valor de R^2 de 0,975.

La **FIG. 2** es una serie de diagramas de barras que demuestran el hallazgo de que Endo5-Cav (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 5) es más potente que AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 5) en el bloqueo de la liberación de NO inducida por VEGF.
55

La **FIG. 2A** es un diagrama de barras que demuestra que, cuando se pretrataban durante 6 horas células endoteliales de aorta bovina (BAEC) cultivadas con los péptidos indicados (10^{-5} M) y se estimulaban con VEGF (10^{-9} M) durante 30 minutos como se indica, Endo5-Cav (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 5) bloqueaba completamente la liberación de NO inducida por VEGF. * $P < 0,05$ en comparación con el vehículo y † $P < 0,05$ en comparación con AP-Cav + VEGF, n = 4 por triplicado.
60

La **FIG. 2B** es un diagrama de barras que demuestra que, cuando se pretrataban BAEC cultivadas con péptidos ($1-50 \times 10^{-6}$ M) durante 6 horas y se estimulaban con VEGF como se describió anteriormente, AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 5) y Endo5-Cav (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO. 5) presentaban un efecto dependiente de la dosis. *P < 0,05 en comparación con el vehículo y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + VEGF, n = 4 por duplicado.

La **FIG. 2C** es un diagrama de barras que demuestra que, cuando se pretrataban BAEC con péptidos (10^{-5} M) durante 1, 2, 4 o 6 horas y se estimulaban con VEGF como se describió anteriormente, AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 5) y Endo5-Cav (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO. 5) presentaban efectos dependientes del tiempo. *P < 0,05 en comparación con el vehículo y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + VEGF, n = 4 por duplicado.

La **FIG. 2D** es un diagrama de barras que demuestra que la sustitución de AP (SEQ ID NO. 2) por Endo5 (SEQ ID NO: 1) y el acortamiento de Cav(82-101) (SEQ ID NO. 5) a CavAB (82-95) (SEQ ID NO. 6) (Endo5-CavAB; 10^{-5} M) bloqueaba completamente la liberación de NO inducida por VEGF, mientras que Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) (2×10^{-6} M), un péptido mucho más corto a una dosis menor, presentaba un efecto similar a AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 6) (10^{-5} M). Esta figura ilustra la potencia mejorada de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6). En este ejemplo, se expusieron células endoteliales aórticas bovinas a péptidos durante 6 h seguido de estimulación con VEGF durante 30 min. Los niveles de nitrito en el sobrenadante celular se determinaron usando un analizador por quimioluminiscencia de NO de Sievers.

La **FIG. 3A** ilustra que el pretratamiento de ratones con AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 5) (1 mg/kg) o la misma dosis molar de Endo5-Cav (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 5) durante 1 hora prevenía el aumento de permeabilidad vascular inducido por aceite de mostaza (oído derecho; 30 minutos), mientras que los péptidos de control no presentaban un efecto significativo. En este ejemplo, los oídos izquierdos se pintaron con aceite mineral solo (vehículo, control de referencia) y los ratones de preinyectaron con azul de Evans. *P < 0,05 en comparación con el péptido de control y † P < 0,05 en comparación con AP-Cav + aceite de mostaza. n = 6 u 8 por grupo por duplicado.

La **FIG. 3B** proporciona valores representativos para los datos de la FIG. 3A.

La **FIG. 4A** es una gráfica que muestra la linealidad entre la concentración de péptido en solución y los valores de fluorescencia. En este ejemplo, se realizaron lecturas de fluorescencia para concentraciones similares de rodamina-AP (rod-AP) y carboxifluoresceína-Endo5 (cFluo-Endo5) disueltas en la misma solución de lisis celular usada en la **FIG. 4B**. Los péptidos se usaron individualmente para prevenir la interferencia.

La **FIG. 4B** es una gráfica que muestra que la tasa de internalización de carboxifluoresceína-Endo5 es mayor que la de rodamina-AP. En este ejemplo, se incubaron células endoteliales de aorta bovina durante 1, 2, 4 o 6 horas con péptidos individuales, se lavaron con ácido, aclararon, tripsinizaron, lisaron y se determinó la fluorescencia interna total y se convirtió a moles de péptidos por 10^6 usando una curva estándar. Las células incubadas con péptidos durante 5 min y tratadas como se describe se usaron como señal de fondo para la tinción no internalizada.

La **FIG. 5A** ilustra el tratamiento de imágenes en vivo usando un microscopio de epifluorescencia de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) cultivadas y sin fijar que se trataron con carboxifluoresceína-Endo5 (izquierda) o rodamina-AP (centro; 10^{-5} M) durante 1 hora (pulso) y se aclararon. Cabe observar la tinción punteada con ambos péptidos y la ausencia de tinción nuclear (zona oscura de forma ovalada). Las imágenes fusionadas mostraron la localización (derecha) entre ambos péptidos.

La **FIG. 5B** ilustra que la colocalización (derecha) entre ambos péptidos todavía se visualizaba en el tratamiento de imágenes en vivo después de seguir la localización de los péptidos durante dos horas en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) vivas.

La **FIG. 5C** ilustra que, cuando se pretrataban células endoteliales de aorta bovina cultivadas con indistintamente AP (SEQ ID NO. 2) o Endo5 (SEQ ID NO: 1) (ambas a 5×10^{-5} M) y se incubaban durante 6 h con indistintamente AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 5) o Endo5-Cav (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO. 5) (ambos a 10^{-5} M) y se estimulaban con VEGF (10^{-9} M) como describen e ilustran las **FIG. 2A-2D**, Endo5 y AP prevenían la inhibición por AP-Cav y Endo5-Cav de la liberación de NO inducida por VEGF. *P < 0,05 en comparación con el vehículo, n = 6 por grupo por triplicado.

La **FIG. 6** ilustra la eficacia de la cavtratin mediante inyección intravítrea. En esta realización, las ratas se sometieron a neovascularización inducida por láser.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Las abreviaturas usadas en el presente documento tienen su significado convencional dentro de las técnicas química y biológica.

5

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

10

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que es suficiente para efectuar la aplicación prevista, que incluye, pero no se limita a, el tratamiento de la enfermedad, como se define más adelante. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en función de la aplicación prevista (*in vitro* o *in vivo*), o del sujeto y el estado de la enfermedad que se está tratando, p. ej., el peso y la edad del sujeto, la gravedad del estado de la enfermedad, la manera de administración y similares, que pueden ser fácilmente determinados por un experto en la materia. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en células diana, p. ej., la reducción de adherencia plaquetaria y/o migración celular. La dosis específica variará en función de los compuestos particulares elegidos, del régimen de dosificación que se va a seguir, de si se administra en combinación con otros compuestos, de la regulación del tiempo de administración, del tejido al que se administra y del sistema de entrega física donde se transporta.

15

20

Como se emplean en el presente documento, "tratamiento" o "tratar", o "paliar" o "mejorar" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos se refieren a una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando. Asimismo, un beneficio terapéutico se consigue con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados al trastorno subyacente, tales como una mejora observada en el paciente, a pesar de que el paciente puede seguir estando aquejado del trastorno subyacente. Para un beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un paciente con riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que notifique uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque puede que no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad. El tratamiento o la mejora de los síntomas se pueden basar en parámetros objetivos o subjetivos; que incluyen los resultados de un examen físico, una (auto)evaluación funcional y/o cualquier forma de evaluación visual.

25

30

El "efecto terapéutico", como se emplea en el presente documento, abarca un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico como se describió anteriormente. Un efecto profiláctico incluye retardar o eliminar la aparición de una enfermedad o afección, retardar o eliminar la aparición de síntomas de una enfermedad o afección, ralentizar, detener o invertir la progresión de una enfermedad o afección, o cualquier combinación de los mismos.

35

Los términos "coadministración", "administrado en combinación con" y sus equivalentes gramaticales, como se emplean en el presente documento, abarcan la administración de dos o más agentes a un sujeto para que ambos agentes y/o sus metabolitos estén presentes en el sujeto al mismo tiempo. La coadministración incluye la administración simultánea en composiciones individuales, la administración en momentos diferentes en composiciones individuales o la administración en una composición donde están presentes ambos agentes.

40

45

El término "*in vivo*" se refiere a un evento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

El término "*in vitro*" se refiere a un evento que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto.

Por ejemplo, un ensayo *in vitro* abarca cualquier ensayo realizado que no sea un ensayo de un sujeto. Ensayos *in vitro* abarca ensayos basados en células donde se emplean células vivas o muertas. Ensayos *in vitro* también abarca un ensayo exento de células donde no se emplean células intactas.

50

Como se emplea en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, sirve para abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados.

55

Como se emplea en el presente documento, el término "péptido transportador" o "PPC" se refiere a un péptido permeable a las células, que se define como un péptido capaz de penetrar y/o atravesar una membrana celular.

60

Como se emplea en el presente documento, el término “constructo transportador” se refiere a un constructo que atraviesa la membrana celular, donde el constructo comprende el péptido transportador y al menos un resto de carga, donde el resto de carga atraviesa la membrana celular a una velocidad inferior o un grado inferior que el constructo transportador. En una realización, el resto de carga se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico; péptido; 5 proteína; oligosacárido; lípido; glucolípido; lipoproteína; compuesto de molécula pequeña; fármaco terapéutico; marcador UV-vis, fluorescente o radioactivo; agente de tratamiento de imágenes; agente de diagnóstico; agente profiláctico; liposoma y virus. En otra realización, el resto de carga se enlaza al péptido transportador a través de un enlace covalente o no covalente.

10 Como se emplea en el presente documento, el término “Endo5” se refiere al péptido de SEQ ID NO. 1 o una sal del mismo.

Como se emplea en el presente documento, el término “AP” se refiere al péptido de SEQ ID NO. 2 o una sal del mismo.

15 Como se emplea en el presente documento, el término “CE” se refiere a célula(s) endotelial(es).

Como se emplea en el presente documento, el término “RHMVEC” se refiere a célula(s) endotelial(es) microvasculares de corazón de rata.

20 Como se emplea en el presente documento, el término “BAEC” se refiere a célula(s) endotelial(es) de aorta bovina.

Como se emplea en el presente documento, el término “azul de Evans” se refiere a una sal del (6E,6'E)-6,6-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1E)hidrazin-2-il-1-ilideno]bis(4-amino-5-oxo-5,6-dihidronaftaleno-1,3-disulfonato).

25 Como se emplea en el presente documento, el término “unión” se refiere a la adherencia de moléculas entre sí, tal como, pero no limitada a, enzimas a sustratos, anticuerpos a antígenos, cadenas de ADN a sus cadenas complementarias. La unión se produce porque la forma y naturaleza química de partes de las superficies moleculares son complementarias. Un modelo habitual es el “llave-cerradura” usado para describir cómo se adaptan las enzimas a su sustrato. En un ejemplo no limitante, la unión de la proteína caveolina puede producirse en uno o más dominios de 30 la eNOS, tales como, pero no limitados a, el dominio oxigenasa de la eNOS y/o el dominio reductasa de la eNOS.

Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal donde el animal no puede mantener la homeostasis y donde, si la enfermedad no ha mejorado, entonces la salud del animal continúa deteriorándose.

35 Un “trastorno” en un animal es un estado de salud donde el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero donde el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no causa necesariamente un deterioro adicional en el estado de salud del animal.

Una enfermedad o trastorno se “alivia” si la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la 40 que un paciente experimenta tal síntoma, o ambas, se reducen.

Como se emplea en el presente documento, el término “polipéptido” se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácido, variantes estructurales presentes en la naturaleza relacionadas y análogos sintéticos del mismo no presentes en la naturaleza enlazados mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, 45 por ejemplo, usando un sintetizador peptídico automatizado.

Como se emplea en el presente documento, el término “proteína” típicamente se refiere a polipéptidos grandes.

Como se emplea en el presente documento, el término “péptido” típicamente se refiere a polipéptidos cortos. 50

En el presente documento se usa la notación convencional para representar las secuencias de polipéptido: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptido es el amino terminal y el extremo derecho de una secuencia de polipéptido es el carboxilo terminal.

55 Como se emplea en el presente documento, el término “ANP” se refiere a un ácido nucleico peptídico.

El término “variante de secuencia de aminoácidos” se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Normalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente 70 % de homología, al menos aproximadamente 80 % de 60 homología, al menos aproximadamente 90 % de homología, o al menos 95 % de homología con el polipéptido nativo. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones

dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

- Como se emplean en el presente documento, los términos “variación conservadora” o “sustitución conservadora”, como se emplean en el presente documento, se refieren a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Las variaciones o sustituciones conservadoras no es probable que cambien la forma de la cadena peptídica. Los ejemplos de variaciones, o sustituciones, conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o glutamina por asparagina.
- 10 Como se emplea en el presente documento, el término “dominio” se refiere a una parte de una molécula o estructura que comparte características fisicoquímicas comunes, tales como, pero no limitadas a, dominios o propiedades hidrófobos, polares, globulares y helicoidales. Los ejemplos específicos de dominios de unión incluyen, pero no se limitan a, dominios de unión de ADN y dominios de unión de ATP.
- 15 Como se emplea en el presente documento, el término “péptido heterólogo” se refiere a cualquier péptido, polipéptido o proteína cuya secuencia se selecciona de tal manera que el producto de la fusión de esta secuencia con el dominio de translocación de membrana tiene una secuencia diferente de la secuencia de tipo silvestre que flanquea cualquier dominio de translocación de membrana.
- 20 Como se emplea en el presente documento, el término “dominio de translocación de membrana” se refiere a un péptido capaz de penetrar la membrana de una célula y que se usa para transportar péptidos fijados a una célula *in vivo*.
- Como se emplea en el presente documento, el término “dominio de andamiaje de la caveolina” se refiere a dominios, incluso dominios de andamiaje putativos, de cualquier proteína caveolina. Por tanto, el término, como se emplea en el presente documento, no se limita a dominios de andamiaje putativos. La secuencia de ARNm completa de la Cav-1 humana se puede encontrar en el n.º de entrada del GenBank BAG70230.1 (SEQ ID NO. 3). El código de proteína completo de la Cav-3 humana se puede encontrar en el n.º de entrada del GenBank AAC39758.1 (SEQ ID NO. 4). Información adicional acerca de estas y otras secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), en ncbi.nlm.nih.gov de la Red Informática Mundial.
- 25 Los ejemplos de dominios de andamiaje de la caveolina incluyen, pero no se limitan a, los aminoácidos 82-101 de la caveolina-1 humana (⁸²DGIWKASFTTFTVTKYWYR¹⁰¹) (SEQ ID NO. 5) o equivalentes de los mismos; los aminoácidos 82-95 de la caveolina-1 humana (⁸²DGIWKASFTTFTVT⁹⁵) (SEQ ID NO. 6) o equivalentes de los mismos.
- 30 Como se emplea en el presente documento, el término “tratamiento” o “tratar” se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico, es decir, un compuesto útil en la invención (solo o en combinación con otro agente farmacéutico), a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o una línea celular aislados de un paciente (p. ej., para el diagnóstico o aplicaciones *ex vivo*), que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de una enfermedad o trastorno o el potencial para desarrollar una enfermedad o trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, paliar, mejorar o influir en la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno, o el potencial para desarrollar la enfermedad o trastorno. Tales tratamientos se pueden personalizar o modificar en función de los conocimientos obtenidos del campo de la farmacogenómica.
- 45 Como se emplea en el presente documento, el término “prevenir” o “prevención” significa ausencia de desarrollo del trastorno o la enfermedad si no se había producido, o ausencia de desarrollo adicional del trastorno o la enfermedad si ya había habido desarrollo del trastorno o la enfermedad. También se considera la capacidad de prevenir alguno o todos los síntomas asociados al trastorno o la enfermedad.
- 50 Como se emplea en el presente documento, el término “paciente”, “individuo” o “sujeto” se refiere a un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tal como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y marinos. Preferiblemente, el paciente, individuo o sujeto es humano.
- 55 Como se emplea en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material, tal como un vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin causar efectos biológicos no deseables o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición donde está contenido.
- 60 Como se emplea en el presente documento, el término “composición” o “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil en la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición

farmacéutica facilita la administración del compuesto a un paciente. En la técnica existen múltiples técnicas para administrar un compuesto que incluyen, pero no se limitan a, la administración intravenosa, oral, mediante aerosol, inhalatoria, rectal, vaginal, transdérmica, intranasal, bucal, sublingual, parenteral, intratecal, intragástrica, oftálmica (que incluye, pero no se limita a, intravítrea, intracameral, retrobulbar, subconjuntival, supracoroidal, etc.), pulmonar y tópica.

Como se emplea en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, estabilizante, agente dispersante, agente de suspensión, diluyente, excipiente, agente espesante, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, implicado en el transporte o acarreo de un compuesto útil en la invención al paciente o a su interior de tal manera que pueda realizar su función prevista. Típicamente, tales constructos se acarrean o transportan desde un órgano, o parte del cuerpo, hasta otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, que incluyen el compuesto útil en la invención, y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sucrosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agentes tensioactivos; ácido alginico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato y otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en formulaciones farmacéuticas. Como se emplea en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" también incluye todos y cada uno de los revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción y similares que son compatibles con la actividad del compuesto útil en la invención, y son fisiológicamente aceptables para el paciente. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones. El "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir además una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto útil en la invención.

Otros ingredientes adicionales que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas usadas en la puesta en práctica de la invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA).

A lo largo de esta descripción, diversos aspectos de la invención se pueden presentar en forma de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo se da simplemente por conveniencia y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo se debe considerar que describe específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 se debe considerar que describe específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1; 2; 2,7; 3; 4; 5; 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Composiciones ejemplares

Como se describe en el presente documento, Endo5, un péptido corto de cinco aminoácidos (RRPPR-SEQ ID NO.1), es un péptido permeable a las células (PPC) muy potente. Endo5 se aisló a través de un procedimiento de selección competitiva por su capacidad para ser internalizado rápidamente por las células endoteliales vasculares y demostró aumentar la absorción de carga por las células y aumentar la actividad terapéutica de una carga a la que esté conjugado.

Como se describe en el presente documento, Endo5 fue el péptido generado aleatoriamente más altamente enriquecido cuando se expresó en la superficie de fagos seleccionados por la capacidad para ser internalizados rápidamente por las células endoteliales. La potencia máxima de Endo5-Cav en la inhibición de la liberación de NO inducida por VEGF fue mayor que la de AP-Cav sobre una base molar similar. Además, a pesar de su menor tamaño, (Endo5 es un péptido 5-mer frente a AP que es un péptido 16-mer), la tasa de absorción de Endo5 fue tres veces mayor que la de AP. Se encontró que Endo5-Cav es más potente que AP-Cav en la inhibición de la permeabilidad vascular *in vivo*.

Mecánicamente, las rutas celulares implicadas en la absorción de Endo5 parecen similares a las de AP. Esto está respaldado por la colocalización significativa entre Endo5 y AP durante la endocitosis inicial y la distribución intracelular; la inhibición competitiva del efecto de Endo5-Cav por AP y la inhibición competitiva de la actividad de

AP-Cav por Endo5. Los hallazgos presentados en el presente documento proporcionan pruebas de la “eficacia de internalización por aminoácido” superior de Endo5 en comparación con el AP ya consolidado.

La razón para diseñar un péptido permeable a las células potente para una célula endotelial no solo reside en las diversas enfermedades caracterizadas por actividad celular endotelial aberrante, sino también en la localización estratégica de las células endoteliales entre la sangre y los tejidos subyacentes. Después de la absorción, la distribución del fármaco a través del compartimento vascular se puede alterar rápidamente a través de la eliminación y degradación. Estos mecanismos normales de inactivación de fármaco se pueden compensar mediante la internalización rápida en el punto de acción. Las pruebas de la magnitud de internalización de Endo5 en células endoteliales, en comparación con el conjunto de péptidos permeables a las células generados aleatoriamente que permite ensayar el presente sistema, se ilustran mediante su capacidad para favorecer la absorción de fago en el sistema T7select. Este sistema favorece la absorción rápida exclusivamente a través de la unión de alta afinidad a células endoteliales, ya que permite la expresión superficial de menos de una copia peptídica por fago.

15 Sin desear ceñirnos a ninguna teoría, la distribución intracelular de cargas hacia su diana puede ser, al menos parcialmente, independiente de la secuencia del péptido permeable a las células en base al hecho de que la Cav fusionada a dos péptidos permeables a las células completamente diferentes (Endo5 o AP) atenuaba la actividad de la eNOS, inhibía la permeabilidad vascular y se colocalizaba después de un “seguimiento” de dos horas.

20 Además, es posible que Endo5, así como otros péptidos permeables a las células, pueda permitir diversas rutas de salida de los orgánulos de internalización y/o dirigir la localización intracelular de moléculas de carga de forma distinta. Sin embargo, la diferencia en la tasa de absorción entre Endo5 y AP es el mecanismo probable para racionalizar la diferencia de potencia entre Endo5-Cav y AP-Cav. Esto está respaldado por los datos que documentan la localización similar de Endo5 y AP en células vivas.

25 Por otra parte, el aumento en la potencia de la Cav cuando está fusionada a Endo5 y la casi saturación del efecto de AP-Cav sobre la actividad de la eNOS a dosis altas sugiere que el efecto de AP-Cav podría estar limitado por una tasa de internalización y eliminación/degradación superpuesta en lugar de por una limitación del farmacóforo (Cav). Sin desear ceñirnos a ninguna teoría, esto pone de manifiesto el interés en identificar secuencias de PPC altamente potentes, tales como secuencias que comprenden Endo5.

30 En diversas realizaciones, la invención descrita en el presente documento incluye un péptido transportador aislado que atraviesa una membrana celular. En una realización, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO: 1). En otra realización, el péptido transportador consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 1. En otra realización más, el péptido transportador consiste en la SEQ ID NO. 1. En otra realización más, el péptido transportador se une selectivamente a una célula diana o atraviesa una membrana celular. En otra realización más, la célula comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral.

40 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido transportador que comprende la SEQ ID NO. 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la célula comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral. En otra realización más, la célula consiste en una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral.

45 La invención incluye además un constructo transportador que comprende el péptido de la invención y un resto de carga.

50 En una realización, el constructo transportador comprende un resto de carga enlazado a un péptido transportador que comprende la SEQ ID NO. 1. En otra realización, el péptido transportador consiste en la SEQ ID NO. 1. En otra realización más, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico (y análogos del mismo, tales como un ácido nucleico peptídico o “ANP”); péptido; proteína; oligosacárido; lípido; glucolípido; lipoproteína; fármaco terapéutico; marcador UV-vis, fluorescente o radioactivo; agente de tratamiento de imágenes; agente de diagnóstico; agente profiláctico; liposoma y virus (tal como bacteriófago T-7).

55 En una realización, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6 y 11-19. En otra realización, el constructo transportador comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 16	SEQ ID NO. 12-SEQ ID NO. 1
---------------------------	----------------------------	----------------------------

SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 17	SEQ ID NO. 13-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 18	SEQ ID NO. 14-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 6	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 19	SEQ ID NO. 15-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 3-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 16-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 12	SEQ ID NO. 4-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 17-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 5-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 18-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 14	SEQ ID NO. 6-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 19-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 11-SEQ ID NO. 1	

En otra realización más, el constructo transportador se selecciona del grupo que consiste en:

SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 16	SEQ ID NO. 12-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 17	SEQ ID NO. 13-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 18	SEQ ID NO. 14-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 6	SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 19	SEQ ID NO. 15-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 3-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 16-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 12	SEQ ID NO. 4-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 17-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 5-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 18-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 14	SEQ ID NO. 6-SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 19-SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 11-SEQ ID NO. 1	

5 En otra realización, las composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El resto de carga se puede combinar con, o enlazar a, el péptido transportador para formar el constructo transportador de la presente invención. El péptido transportador y el resto de carga se combinan o enlazan de tal manera que permanecen combinados o enlazados en las condiciones donde se usa el constructo transportador (p. ej., en las

10 condiciones donde el constructo transportador se administra a un individuo). En una realización, el resto de carga se enlaza covalentemente al péptido transportador a través de un grupo enlazador o un enlace químico. Alternativamente, el péptido transportador y el resto de carga se combinan a través de un enlace no covalente, tal como una interacción electrostática y/o hidrofoba.

15 La presente descripción incluye variantes funcionalmente equivalentes de péptidos descritos en otra parte del presente documento. Tales variantes incluyen péptidos con sustituciones de aminoácidos que mantienen la integridad funcional del péptido original. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos incluyen aquellas que dan como resultado cambios en el péptido donde se mantiene una carga, polaridad, hidrofobicidad o estructura similar del aminoácido original. Las variantes peptídicas también incluyen peptidomiméticos. Los peptidomiméticos incluyen péptidos modificados

20 químicamente y moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos no presentes en la naturaleza.

En una realización, los péptidos de la presente invención se pueden obtener a partir de fuentes donde están presentes en la naturaleza o producir usando técnicas conocidas, tales como métodos de síntesis química o ingeniería genética (p. ej., tecnología del ADN o ARN recombinante. En otra realización, los péptidos de la invención se pueden preparar

25 usando métodos de síntesis peptídica en fase sólida (o en fase solución) estándar, como se sabe en la técnica. Además, el ADN que codifica estos péptidos se puede sintetizar usando instrumentación de síntesis de oligonucleótidos comercializada y producir recombinantemente usando sistemas de producción recombinante

estándar. La producción que usa síntesis peptídica en fase sólida se necesita si se van a incluir aminoácidos no codificados por genes.

En una realización, los péptidos aislados de la presente invención están relativamente exentos de péptidos no relacionados, así como de polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otro material celular contaminante que normalmente están asociado al péptido en una célula o que están asociados al péptido en una biblioteca.

Los constructos transportadores de la invención son útiles para la entrega de restos de carga a través de la membrana. Los constructos transportadores de la invención también son útiles para la entrega de restos de carga a una célula diana (p. ej., un tipo de célula específico, tal como una célula cardíaca) y para la entrega de restos de carga a una célula diana y/o a través de la membrana de la célula diana.

Los péptidos transportadores de la presente invención tienen la capacidad de atravesar la membrana celular de una célula (p. ej., internalizarse al interior de la célula). Por ejemplo, en una realización de la invención, un péptido transportador se transloca desde el entorno extracelular de una célula, penetra la bicapa lipídica de la membrana celular y atraviesa la membrana celular al interior del entorno intracelular de la célula. En otra realización, los péptidos transportadores de la presente invención se unen selectivamente a una célula diana. En otra realización más, los péptidos transportadores se unen selectivamente y atraviesan la membrana celular de una célula diana. Una célula diana es un tipo de célula específico tal como, por ejemplo, una célula cardíaca, una célula cutánea (p. ej., una célula endotelial), una célula del músculo esquelético o una célula cerebral (p. ej., una neurona), pero puede ser cualquier célula, lo que incluye células humanas y no humanas.

En un ejemplo no limitante, un péptido transportador de la invención está enlazado a un resto de carga y transporta el resto de carga a través de la membrana celular de una célula. Por ejemplo, en una realización, una proteína, tal como la caveolina o un factor de transcripción, enlazada a un péptido transportador se lleva desde el entorno extracelular de una célula y se transporta a través de la membrana celular y al interior del entorno intracelular de la célula. En otra realización, un péptido transportador de la invención enlazado a un resto de carga une selectivamente el resto de carga a una célula diana (p. ej., una célula cardíaca). En otra realización más, el péptido transportador enlazado a un resto de carga une selectivamente el resto de carga a una célula diana (p. ej., una célula cardíaca) y transporta el resto de carga desde el entorno extracelular de la célula diana, a través de la membrana celular, y al interior del entorno intracelular de la célula diana.

En una realización, el resto de carga comprende un compuesto orgánico o inorgánico. El compuesto orgánico se puede aislar de la naturaleza (p. ej., a partir de células donde está presente) o se puede producir usando métodos conocidos, tales como métodos de ingeniería genética (p. ej., tecnología del ADN o ARN recombinante) o métodos sintéticos químicos. Por ejemplo, una molécula orgánica puede ser una molécula de ARN, un polipéptido o un fragmento del mismo, que puede aislarse de una célula, expresarse a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante o sintetizarse químicamente. Una molécula orgánica también puede ser una molécula no presente en la naturaleza. Un ejemplo no limitante de una molécula no presente en la naturaleza es una secuencia de ácido nucleico que contiene análogos de nucleósidos no presentes en la naturaleza o enlaces fosforotioato que enlazan los nucleótidos y protegen frente a la degradación por las nucleasas. Un ribonucleótido que contiene un grupo 2-metilo, en lugar del grupo hidroxilo normal, unido al átomo de carbono 2' de residuos de ribosa, es un ejemplo de una molécula de ARN no presente en la naturaleza que es resistente a la degradación enzimática y química. Otros ejemplos de moléculas orgánicas no presentes en la naturaleza incluyen el ARN que contiene 2'-aminopirimidinas (donde tal ARN es 1000 veces más estable en suero humano y orina, en comparación con el ARN presente en la naturaleza, Lin y col., 1994, Nucl. Acids Res. 22:5229-5234, y Jellinek y col., 1995, Biochemistry, 34:11363-11372).

En una realización, el resto de carga comprende un ADN, un ARN o un análogo de ácido nucleico. El ADN o ARN puede ser un oligo(desoxi)nucleótido de cualquier longitud. Tales moléculas de ácido nucleico pueden ser lineales, circulares o superhélices; pueden ser ADN o ARN monocatenario o bicatenario; o pueden ser un híbrido de ADN/ARN. Los análogos de ácido nucleico incluyen análogos de cadena principal cargada o no cargada, tales como fosfonatos (p. ej., fosfonatos de metilo), fosforoamidatos (N3' o N5'), tiofosfatos, polímeros a base de morfolino no cargados y ácidos nucleicos peptídicos (ANP). Tales moléculas se pueden usar en una variedad de regímenes terapéuticos, que incluyen la terapia de reemplazo enzimático, terapia génica y terapia antisentido, por ejemplo. Los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) son análogos del ADN. La cadena principal de un ANP está formada por enlaces peptídicos en lugar de ésteres fosfato, lo que lo hace apropiado para aplicaciones antisentido. Como la cadena principal no está cargada, los dúplex ANP/ADN o ANP/ARN presentan una estabilidad térmica mayor de la normal. Los ANP tienen la ventaja adicional de que no son reconocidos por las nucleasas o proteasas. Los ANP se pueden sintetizar en un sintetizador peptídico automatizado usando química t-Boc estándar. El ANP se puede enlazar a un péptido transportador de la invención usando métodos conocidos en la técnica.

En una realización, el resto de carga es un polipéptido. En otra realización, el resto de carga comprende caveolina o un fragmento de la misma. En otra realización más, el resto de carga es un factor de transcripción o un péptido de localización nuclear. En otra realización más, están presentes dos restos de carga, uno que comprende un factor de transcripción y el otro que comprende un péptido de localización nuclear, en el constructo transportador de la
5 invención.

En una realización, el resto de carga comprende un marcador, tal como un colorante o un compuesto marcado radioactivamente. En otra realización, el resto de carga comprende rodamina. En otra realización más, el resto de carga comprende un marcador, tal como proteína verde fluorescente, proteína azul fluorescente, proteína amarilla
10 fluorescente, biotina o mezclas de las mismas.

En un ejemplo no limitante, se pueden usar técnicas recombinantes para fijar covalentemente un péptido transportador a un resto de carga, tal como unir ADN o ARN que codifica el péptido transportador con ADN o ARN que codifica el resto de carga y expresar los productos codificados en una célula huésped apropiada (una célula capa de expresar el
15 constructo transportador).

Alternativamente, las dos secuencias de nucleótidos individuales se pueden expresar en una célula o se pueden sintetizar químicamente y posteriormente combinar, usando técnicas conocidas. Alternativamente, el péptido transportador-resto de carga se puede sintetizar químicamente como una única secuencia de aminoácidos y, por
20 tanto, no es necesario combinarlos.

En una realización, cuando hay más de un resto de carga enlazado al péptido transportador, el más de un resto puede ser el mismo o diferente. En otra realización, el resto o restos de carga se enlazan al péptido transportador en indistintamente el N- o C-terminal del péptido transportador. En el caso donde hay al menos dos restos de carga
25 enlazados al péptido transportador, un resto de carga puede estar enlazado al N-terminal del péptido transportador y un resto de carga puede estar enlazado al C-terminal del péptido transportador. Alternativamente, se puede enlazar más de un resto de carga a indistintamente el N- o C-terminal del péptido transportador.

En una realización, el resto de carga se puede enlazar a un péptido transportador de la presente invención indistintamente directamente (es decir, a través de un enlace químico) o indirectamente por medio de un grupo enlazador. Los grupos enlazadores incluyen, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácido. El grupo enlazador puede ser, por ejemplo, una secuencia corta de 10 residuos de aminoácido (p. ej., 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 4 residuos de aminoácido), y puede incluir opcionalmente un residuo de cisteína a través del cual el grupo enlazador se une al péptido transportador o al resto de carga del constructo transportador. Un grupo enlazador también puede ser un grupo
35 tal como un grupo sulfhidrilo o grupo carboxilo.

Los grupos enlazadores adecuados incluyen restos alquilo, arilo, aralquilo o peptídicos bi- y multifuncionales, aldehídos, ácidos, ésteres y anhídridos de alquilo, arilo o aralquilo, grupos sulfhidrilo o carboxilo, tales como derivados del ácido maleimidobenzoico, derivados del ácido maleimidopropiónico y derivados de succinimido, o pueden
40 obtenerse a partir de bromuro o cloruro cianúrico, carbonildiimidazol, ésteres de succinimidilo o haluros sulfónicos. Los grupos funcionales sobre el grupo enlazador usado para formar enlaces covalentes entre el grupo enlazador y el resto de carga, por una parte, así como entre el grupo enlazador y el péptido transportador por la otra, pueden ser dos o más de, p. ej., grupos amino, hidracina, hidroxilo, tiol, maleimido, carbonilo y carboxilo.

45 En una realización, el constructo transportador se puede disociar *in vitro* o *in vivo* para proporcionar el resto de carga y el péptido transportador por medio de escisión química o enzimática. En otra realización, el grupo enlazador comprende residuos de aminoácido, y la escisión *in vitro* o *in vivo* se produce en el grupo enlazador.

En una realización, donde el resto de carga es un polipéptido, el resto de carga se enlaza al péptido transportador como una proteína de fusión por medio de tecnología recombinante. Una proteína de fusión es el enlace covalente y colineal de dos o más proteínas a través de sus cadenas principales peptídicas, mediante expresión genética de una molécula de ácido nucleico que codifica esas proteínas. El ácido nucleico que codifica el resto de carga de la proteína de fusión está en el mismo marco que el ácido nucleico que codifica el polipéptido transportador. "En el mismo marco" significa que la secuencia de ácido nucleico que codifica el resto de carga está en el marco correcto de lectura, al igual
55 que la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido transportador. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos correctas se traducen para tanto el péptido transportador como el resto de carga de la proteína de fusión.

En una realización, el resto de carga se conjuga al péptido transportador mediante reticulación química. Se conocen numerosos métodos de reticulación química y son útiles para enlazar los péptidos transportadores de esta invención a
60 un resto de carga. El acoplamiento del resto de carga y el péptido transportador se puede lograr mediante un agente de acoplamiento o enlazador. Los reactivos de reticulación intramolecular que se pueden utilizar se ejemplifican en Means

& Feeney, Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, 1974, páginas 39-43, y Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Entre estos reactivos están, por ejemplo, el 3-(2-piridil)propionato de N-succinimidilo ("SPDP") o la N,N'-(1,3-fenileno)bismaleimida (ambos son altamente específicos para grupos sulfhidrilo y forman enlaces irreversibles); la N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otros reactivos
5 tales que tienen puentes metileno en 6 a 11 carbonos (que son relativamente específicos para grupos sulfhidrilo); y el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina).

Otros reactivos de reticulación útiles para este fin incluyen: p,p'-difluoro-m,m'- dinitrodifenilsulfona (que forma reticulaciones irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico para grupos
10 amino); fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con grupos amino); hexametilendiisocianato o diisocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con diferentes cadenas laterales) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

15 En una realización, los reactivos de reticulación producen un constructo transportador que es esencialmente no escindible en condiciones celulares. En otra realización, el reactivo de reticulación contiene un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es escindible en condiciones celulares. Por ejemplo, el ditiobis(succinimidilpropionato) ("DSP"), reactivo de Traut y 3-(2-piridil)propionato de N-succinimidilo ("SPDP") son agentes de reticulación escindibles bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación escindible permite que el péptido transportador se separe del resto de
20 carga después de la entrega al interior de la célula diana. Un constructo que comprende un enlace disulfuro directo también puede ser útil en los métodos de la invención. En una realización, el reactivo de reticulación, tal como éster N-gamma-maleimidobutiloxi-succinimida ("GMBS") y sulfo-GMBS, tiene inmunogenicidad reducida.

La presente invención incluye además una composición que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que
25 codifica el polipéptido que tiene los péptidos de fusión y las sustituciones conservadoras de nucleótidos de los mismos, preferiblemente en forma aislada para generar las composiciones de la invención. Las sustituciones conservadoras de nucleótidos incluyen sustituciones de nucleótidos que no afectan a la codificación de un aminoácido particular, ya que la mayoría de aminoácidos tienen más de un codón. Las sustituciones conservadoras de nucleótidos, por tanto, también incluyen mutaciones silenciosas y uso diferencial de codones.
30

En una realización, el ácido nucleico codifica un péptido transportador que comprende la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el ácido nucleico codifica un péptido transportador que consiste en la SEQ ID NO. 1. En otra realización, el ácido nucleico comprende 5'-CGGCGCCGCTCGT-3' (SEQ ID NO. 7).

35 En una realización, la composición comprende además un ácido nucleico aislado que codifica al menos un resto de carga. En otra realización, el resto de carga se selecciona del grupo que consiste en un péptido; una proteína; un compuesto biológicamente activo; un marcador; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente terapéutico y un agente profiláctico. En otra realización más, el resto de carga comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6. En otra realización más, la composición comprende
40 además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción incluye además un vector de expresión y una célula huésped aislada que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende la SEQ ID NO. 1. En una realización, el péptido consiste en la SEQ ID NO. 1.
45

La presente descripción incluye también un vector de expresión y una célula huésped aislada que comprende un ácido nucleico que codifica un resto de carga enlazado al péptido que comprende la SEQ ID NO. 1. En una realización, el péptido consiste en la SEQ ID NO. 1.

50 En una realización, el constructo transportador comprende una proteína de fusión. En otra realización, el vector o la célula huésped comprende además elementos de activación transcripcional que posibilitan la expresión del ácido nucleico que codifica el péptido transportador. Los vectores del sistema de expresión, que incorporan los elementos reguladores necesarios para la expresión proteica, así como sitios de restricción endonucleasa que facilitan la clonación de las secuencias deseadas en el vector, son conocidos por los expertos en la materia. En una realización, el
55 resto de carga está en el mismo marco que el ácido nucleico que codifica el péptido transportador.

En un ejemplo no limitante, un vector de expresión de ADN recombinante que contiene los elementos descritos anteriormente se introduce en una célula huésped apropiada (es decir, una célula capaz de expresar el constructo transportador) donde los mecanismos celulares de la célula huésped dirigen la expresión de la proteína de fusión
60 codificada por el vector de expresión de ADN recombinante. Alternativamente, se pueden usar sistemas exentos de células conocidos por los expertos en la materia para la expresión de la proteína de fusión.

La proteína de fusión purificada producida por el sistema de vector de expresión en la célula huésped se puede administrar a continuación a la célula diana, donde el péptido transportador media la importación de la proteína de fusión a través de la membrana celular de la célula diana al interior de la célula. Una célula diana es un tipo de célula específico tal como, por ejemplo, una célula cardíaca, una célula cutánea, tal como una célula endotelial, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral (p. ej., una neurona), pero puede ser cualquier célula, lo que incluye células humanas y no humanas.

Un sistema de vector de expresión en la célula huésped se puede seleccionar entre varios de tales sistemas conocidos por los expertos en la materia. En una realización, la proteína de fusión se puede expresar en células huésped aisladas, tales como *Escherichia coli*. En otra realización, las proteínas de fusión se pueden expresar en otros sistemas de expresión bacterianos, sistemas de expresión virales, sistemas de expresión eucariotas o sistemas de expresión exentos de células. Los huéspedes celulares usados por los expertos en la materia incluyen, pero no se limitan a, células aisladas tales como, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*, así como en células de mamífero tales como NIH3T3, HeLa, HEK293, HUVEC, células del músculo liso aórtico de rata y células del músculo liso humano adulto. El vector de expresión seleccionado por un experto en la materia incluye elementos de activación transcripcional tales como elementos promotores y otros elementos reguladores apropiados para la célula huésped o el sistema exento de células donde se expresará la proteína de fusión. En los sistemas de expresión de mamífero, por ejemplo, los vectores de expresión adecuados pueden incluir plásmidos de ADN, virus de ADN y virus de ARN. En los sistemas de expresión bacterianos, los vectores adecuados pueden incluir vectores de ADN de plásmido y de bacteriófago.

Los ejemplos no limitantes de sistemas de vector de expresión específicos incluyen el sistema de vector pBAD/gIII (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para expresión proteica en *E. coli*, que está regulado por el regulador transcripcional AraC. Un ejemplo de un vector para expresión en mamíferos es el vector de expresión eucariota pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen). En este vector, el constructo transportador se puede expresar en niveles altos bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV) fuerte. Una cola de polihistidina (His₆) C-terminal hace posible la purificación del constructo transportador usando resina quelante de níquel. La proteína secretada producida por este vector se puede detectar usando un anticuerpo anti-His (C-term).

También se puede usar un sistema de expresión de baculovirus para la producción de un constructo transportador que comprende el péptido transportador y un resto de carga donde el resto de carga es un polipéptido. Un baculovirus usado habitualmente es AcMNPV. La clonación del ADN del constructo transportador se puede lograr usando recombinación homóloga. En un ejemplo no limitante, la secuencia de ADN del constructo transportador se clona en un vector de transferencia que contiene un promotor de baculovirus flanqueado por ADN de baculovirus, particularmente ADN del gen de la polihedrina. Este ADN se transfecta en células de insecto, donde se produce la recombinación homóloga para insertar el ADN del constructo transportador en el genoma del virus precursor. Los recombinantes se identifican por la morfología plaquetaria alterada.

Muchos constructos transportadores donde el resto de carga es un péptido o una proteína que no se puede modificar postraduccionalmente de forma apropiada en sistemas de expresión bacterianos se pueden expresar en su lugar con vectores de baculovirus. Las enzimas, moléculas de señalización, mediadores del control del ciclo celular, factores de transcripción, péptidos antigénicos, productos proteicos de longitud completa de origen viral, bacteriano u otro para uso en terapia con vacunas, productos proteicos de células humanas para uso en terapia contra el cáncer con vacunas, toxinas y proteínas implicadas en los sistemas de señalización celular que no se pueden modificar postraduccionalmente de forma apropiada en sistemas de expresión bacterianos se pueden expresar con vectores de baculovirus.

Las proteínas como se describieron anteriormente también se pueden producir por el método de la presente invención mediante sistemas de expresión virales de mamífero. También se puede usar un sistema de expresión de mamífero inducible por ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para expresar el constructo transportador donde el constructo transportador es una proteína de fusión.

En una realización, se pueden usar células huésped de levadura, tal como *Pichia pastoris*, para la producción de un constructo transportador mediante el método de la presente invención. La expresión de proteínas heterólogas a partir de plásmidos transformados en *Pichia* se ha descrito en la patente de EE. UU. n.º 5,002,876 de Sreekrishna y col. Los vectores para la expresión en *Pichia* de una proteína de fusión que comprende un péptido transportador de la presente invención y un resto de carga donde el resto de carga es un péptido o una proteína se comercializan como parte de un kit de expresión en *Pichia* (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

La purificación de proteína heteróloga producida en *Pichia* se describió en la patente de EE. UU. n.º 5,004,688 de Craig y col., y las técnicas para la purificación proteica a partir de sistemas de expresión de levadura son bien conocidas por los expertos en la materia. En el sistema de *Pichia*, los vectores comercializados se pueden seleccionar entre aquellos más adecuados para la producción de proteínas citosólicas no glicosiladas y aquellos que son más adecuados para la producción de proteínas glicosiladas secretadas, o aquellos dirigidos a un orgánulo intracelular, para que la expresión proteica apropiada se pueda optimizar para el resto de carga de elección, que es un polipéptido.

Métodos de uso ejemplares

- 10 La presente invención describe un método para entregar un resto de carga a, o al interior de, una célula diana. En una realización, el método comprende poner en contacto la célula diana con un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende un resto de carga y un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, a través del cual el resto de carga se entrega a, o al interior de, la célula diana.
- 15 En algunas realizaciones, el resto de carga se enlaza covalentemente al péptido transportador a través de un grupo enlazador o un enlace químico. En otras realizaciones, el péptido transportador consiste en la SEQ ID NO. 1. En otras realizaciones más, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico; un péptido; una proteína; un oligosacárido; un lípido; un glucolípido; una lipoproteína; un compuesto de molécula pequeña; un fármaco terapéutico; un marcador UV-vis, fluorescente o radioactivo; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente profiláctico; un liposoma y un virus. En otras realizaciones más, la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral. En otra realización más, la célula es de mamífero. En otra realización más, el mamífero es humano.

La presente descripción incluye además un método para entregar un resto de carga a, o al interior de, una célula diana de un sujeto con necesidad del mismo. En una realización, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende el resto de carga y un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, a través del cual el resto de carga se entrega a, o al interior de, la célula diana del sujeto.

- 30 En una realización, el resto de carga se enlaza covalentemente al péptido transportador a través de un grupo enlazador o un enlace químico. En otra realización, el péptido transportador consiste en la SEQ ID NO. 1. En otra realización más, el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico; un péptido; una proteína; un oligosacárido; un lípido; un glucolípido; una lipoproteína; un compuesto de molécula pequeña; un fármaco terapéutico; un marcador UV-vis, fluorescente o radioactivo; un agente de tratamiento de imágenes; un agente de diagnóstico; un agente profiláctico; un liposoma y un virus. En otra realización más, la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral. En otra realización más, la composición se administra mediante al menos una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, oral, inhalatoria, rectal, vaginal, transdérmica, intranasal, bucal, sublingual, parenteral, intratecal, intragástrica, oftálmica, pulmonar y tópica. En otra realización más, el sujeto es un mamífero. En otra realización más, el mamífero es humano.

El método según la presente descripción incluye el tratamiento/prevención de una o más enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (AR), psoriasis, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, diabetes de tipo I, enfermedad de Grave, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple (EM), neuromielitis óptica (NMO), miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad arterial coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad pulmonar intersticial, tiroiditis autoinmune, esclerodermia, esclerosis sistémica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjogren, nefritis autoinmune, síndrome de Goodpasture, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, vasculitis asociada a ANCA, uveítis, esclerodermia, penfigoide bulloso, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Huntington, fibrosis quística, gota, degeneración macular relacionada con la edad, alergia, asma y otras enfermedades autoinmunes que son un resultado de indistintamente inflamación aguda o crónica.

- 55 En una realización adicional, la enfermedad o trastorno es una inflamación aguda o crónica, donde el trastorno puede ser una enfermedad autoinmune. En una realización, el trastorno es artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU) o síndrome del intestino irritable (SII). En realizaciones adicionales, el trastorno es AR o LES. Aparte de las enfermedades crónicas, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser relevantes en lo que respecta a indicaciones agudas tales como trasplante, lesión por isquemia/reperfusión (p. ej., infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular), sepsis (p. Ej., SRIS, SDMO, LPA), aterosclerosis y hemorragia

intracerebral (HIC).

Enfermedades autoinmunes ejemplares

5 En diversas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son útiles para tratar una o más enfermedades autoinmunes.

10 “Enfermedad autoinmune” se refiere a una enfermedad causada por una incapacidad del sistema inmune para distinguir las moléculas extrañas de las moléculas propias y por una pérdida de la tolerancia inmunológica a autoantígenos, lo que da como resultado la destrucción de las moléculas propias. Los ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerodermia, colitis ulcerosa, diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), esclerosis múltiple (EM), neuromielitis óptica (NMO) y artritis reumatoide.

15 En realizaciones específicas, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple, tiroiditis, diabetes de tipo 1, sarcoidosis, psoriasis, rinitis alérgica, dermatitis atópica, miastenia grave, enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (CU), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

20 Otras enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, pancreatitis, colitis ulcerosa, diverticulosis, miastenia grave, vasculitis, psoriasis, esclerodermia, asma, alergia, esclerosis sistémica, vitíligo, artritis tal como osteoartritis, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Kawasaki, arteritis temporal, síndrome de Gullian Barre y neuropatía óptica inflamatoria.

25

Enfermedades inflamatorias ejemplares

En diversas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son útiles para tratar o prevenir una o más enfermedades o trastornos inflamatorios.

30

La respuesta inflamatoria no está asociada necesariamente a estímulos externos, o puede ser causada por sustancias medioambientales no nocivas (en caso de alergias). En ambos casos, una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias sin los controles adecuados conduce a inflamación, que generalmente es el sello distintivo de la inflamación tópica y sistémica, así como a una variedad de enfermedades y trastornos inflamatorios.

35

La inflamación está asociada a una variedad de trastornos tales como eccema y dermatitis, que incluye, por ejemplo, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, eccema dishidrótico, dermatitis numular, dermatitis estasis, dermatitis alérgica, psoriasis, prurito, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, inflamación cutánea, penfigoide cicatricial, esclerodermia, hidradenitis supurativa, necrólisis epidérmica tóxica, acné, osteítis, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), pioderma gangrenoso y síndrome de Behcet.

40

Enfermedades inflamatorias del ojo que incluyen conjuntivitis, uveítis, iritis y escleritis.

45 Enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio, que incluyen enfermedades del tracto respiratorio superior, tales como rinitis y sinusitis, y enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio inferior, que incluyen bronquitis.

Miopatía inflamatoria tal como miocarditis.

50 Otras enfermedades inflamatorias tales como lesiones por isquemia/reperfusión relacionadas con un evento isquémico inflamatorio tal como un accidente cerebrovascular o paro cardíaco.

Otras afecciones inflamatorias tales como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y sepsis.

55 En realizaciones específicas, la enfermedad o trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, diabetes de tipo I o II, asma, lesión pulmonar inflamatoria, lesión hepática inflamatoria, lesión glomerular inflamatoria, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, dermatitis irritativa por contacto, dermatitis seborreica, síndrome de Sjogren, queratoconjuntivitis, uveítis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, una enfermedad inflamatoria de las articulaciones, la piel o el músculo, artritis inflamatoria idiopática aguda o
60 crónica, miositis, una enfermedad desmielinizante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, nefritis intersticial y hepatitis activa crónica.

Uveítis

La uveítis afecta a más de medio millón de personas en los EE. UU. y la forma crónica conduce a 5-20 % de ceguera.

- 5 Se necesitan terapias mejores para la uveítis para reducir tanto el proceimiento inflamatorio agudo como la pérdida visual progresiva. En particular, las terapias que reducen la inflamación y la pérdida visual sin los significativos problemas de tolerabilidad asociados a las terapias actuales conducirían a una mejor visión tanto a corto como a largo plazo para los pacientes con uveítis.
- 10 El objetivo de la terapia inmunosupresora es aliviar los eventos de inflamación aguda en el ojo. La supresión de la inflamación en la uveítis crónica con frecuencia implica un tratamiento con esteroides sistémicos a dosis altas que puede ser prolongado. Incluso en los ojos quiescentes, los esteroides intravítreos mejoran la visión. Sin embargo, los esteroides a estas dosis tienen un perfil de eventos adversos (EA) significativo. Muchos de los EA sistémicos se pueden evitar usando preparaciones intravítreas de esteroides de liberación prolongada (Ozurdex, Retisert, etc.).
- 15 Estas estrategias no evitan los EA oculares de los esteroides, que incluyen los EA que suponen una amenaza para la visión como las cataratas y el glaucoma. Los esteroides con frecuencia consiguen el control a corto plazo de la inflamación, pero no el control de la enfermedad, con recurrencias de la inflamación y la necesidad de terapias inmunosupresoras adicionales habituales en esta población.
- 20 La uveítis es un conjunto de afecciones que presentan en común inflamación del tracto uveal (iris, cuerpo ciliar y coroides), pero con frecuencia implican a la retina. Los objetivos actuales del tratamiento son la supresión de la inflamación usando esteroides en combinación con inmunomoduladores tales como metotrexato, micofenilato mofetilo y modificadores biológicos que incluyen anti-TNF. Para los 60 000 pacientes de uveítis posterior y panuveítis crónica en los EE. UU., el tratamiento con esteroides sistémicos en dosis altas es predominante, con dosis diarias promedio de
- 25 esteroides > 40 mg/día, sustancialmente en exceso con respecto a las directrices del SUN y suficientes para causar eventos adversos significativos, algunos de los cuales suponen una amenaza para la visión por sí mismos.

El uso de inmunomoduladores se ha añadido significativamente a las opciones disponibles de tratamiento, y la mayoría de los pacientes con uveítis crónica se tratan con combinaciones. Sin embargo, a pesar de que estos

30 tratamientos realmente tienen un efecto beneficioso, una fracción significativa de los pacientes con uveítis pierden la visión a pesar del tratamiento. En un estudio, 58 % de los pacientes con panuveítis experimentaron pérdida visual y casi 10 % presentaron ceguera bilateral.

- Los componentes clave del proceimiento inflamatorio en la uveítis incluyen la invasión del ojo por células T y
- 35 macrófagos, la ruptura de la barrera hematorretiniana (BHR), edema, liberación de citoquinas y pérdida de proteína al acuoso y vítreo. Como en la uveítis se activan muchas rutas inflamatorias y las causas subyacentes de la uveítis abarcan un amplio abanico de afecciones inflamatorias, desde la artritis juvenil idiopática hasta la enfermedad de Bechets hasta el sarcoide, es improbable que una estrategia terapéutica que es altamente específica para una única ruta sea eficaz para la mayoría de los pacientes con uveítis. Una estrategia más prometedora es modular los
- 40 proceimientos celulares comunes a múltiples rutas.

- Muchas de las rutas de señalización clave de las células inflamatorias se regulan a través de una estructura celular conocida como caveólas. Las caveólas y la proteína de la cápside caveolina-1 están implicadas en la transducción de
- 45 citoquinas y señales del factor de crecimiento que regulan la función de la barrera vascular y la angiogénesis, que incluye, pero no se limita a, la activación de la NO sintasa y los receptores del VEGF. A nivel molecular, estos eventos de señalización son dependientes de las interacciones proteína-proteína entre la caveolina y sus ligandos.

- Como las interacciones caveolina-proteína son intracelulares, las moléculas que se dirigen a este proceimiento deben poder penetrar las células. El mimético de la caveolina cavtratina, un péptido de fusión de un péptido de penetración
- 50 celular al dominio de andamiaje de la cavtratina, inhibe la activación de la NO y otras señales mediadas por las caveólas. La cavtratina reduce la permeabilidad de los vasos, antagoniza la capacidad de la citoquina CCL2 para favorecer el tránsito monocítico de la barrera hematoencefálica (BHE), reduce la expresión de MMP, suprime las acciones tanto del NGF (por medio de la TrkA) como del VEGF e inhibe la angiogénesis.

- 55 En ciertas realizaciones, se proporciona en el presente documento una terapia novedosa para la uveítis basada en la modulación de la función caveolar por medio del uso de péptidos de dominio de caveolina de penetración celular (cavtratina) híbridos que bloquean la permeabilidad vascular. Una primera generación de la cavtratina ha demostrado bloquear el edema y la invasión celular inflamatoria y mejorar la puntuación clínica en un modelo experimental de encefalitis autoinmune.

60

Esta estrategia terapéutica novedosa para tratar la uveítis modula el papel de la caveolina en la transducción de

señales y aprovecha el papel que juegan las células endoteliales vasculares en la regulación de la respuesta inmune, un papel que es particularmente importante en el ojo y el cerebro, donde las células endoteliales vasculares mantienen y regulan una barrera hematoencefálica significativa.

- 5 Los métodos proporcionados en el presente documento son innovadores a nivel celular, dirigiéndose a la función de las células endoteliales vasculares para modular los procesos inflamatorios a nivel molecular; el mecanismo molecular no es antiinflamatorio por sí mismo, sino que supone la manipulación de la función de la caveolina en las células endoteliales, que juegan un papel clave en la función de guardián de la barrera hematorretiniana (BHR). Inhibiendo la señalización dependiente de la caveolina, se inhibe la transmisión de señales de una variedad de factores de crecimiento y citoquinas, y se suprime la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) y la trans migración de células inmunes a la retina.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento también aportan novedad a la invención descrita. En una realización específica, se usa Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6). Esta molécula es un péptido de penetración celular que usa una secuencia corta novedosa descubierta mediante presentación en fago para favorecer la internalización. Este péptido corto se ha acoplado a un fragmento del armazón de caveolina cuya eficacia está optimizada y es capaz de producir un efecto más robusto que la caveolina a una concentración inferior (**FIG. 1**). Endo5-CavAB es, por tanto, un ejemplo de una segunda generación de cavtratina optimizada que es más potente que la cavtratina.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada. En realizaciones específicas, la composición se proporciona a un sujeto mediante administración (IP) o administración intravítrea (IVT) sistémica.

25 *Esclerosis múltiple (EM)*

Otro ejemplo de enfermedad inflamatoria es la esclerosis múltiple (EM). La EM es una enfermedad inflamatoria crónica e impredecible del SNC, que puede afectar al cerebro y la médula espinal, que habitualmente afecta a adultos jóvenes. Hafler y col. (2005) Immunol Rev 204:208- 31. Al parecer, actualmente es la enfermedad neurológica más habitual de los adultos jóvenes, y normalmente comienza entre los 20 y 40 años, con tendencia a presentarse en mujeres con casi el doble de probabilidad, en comparación con los hombres.

En la EM, la vaina de mielina, el material que rodea y protege las células nerviosas y/o su capacidad para producirla está dañada. Esto se denomina "desmielinización". Este daño tiene el efecto de ralentizar o bloquear los mensajes entre el cerebro y el cuerpo, lo que conduce a los síntomas observados con la EM. La desmielinización y la formación de cicatrices u otras lesiones en áreas diseminadas del cerebro y/o la médula espinal se consideran características de la enfermedad. Beeton y col. (2007) Journal of Visualized Experiments 594-604.

Estas lesiones parecen alterar la conducción nerviosa e inducir los déficits neurológicos invalidantes que varían con la localización de las placas desmielinizadas en el SNC. Beeton y col. (2007) Journal of Visualized Experiments 594-604. Sus signos y síntomas clínicos son variables y dependen de las partes del SNC a las que afecta, y pueden incluir discapacidad motora, sensorial, autónoma y cognitiva. Noseworthy y col. (2000) N Engl J Med 343:938-52.

Sin embargo, algunos síntomas habituales de la EM incluyen: (1) inmensa sensación de fatiga; (2) equilibrio: dificultades para caminar y de coordinación; (3) problemas visuales: visión doble y pérdida de vista; (4) entumecimiento y hormigueo en manos y pies; (5) dolor: tanto leve como agudo; pérdida de fuerza muscular; (6) rigidez y espasmos musculares; (7) cambios de humor: depresión y ansiedad; (8) problemas de memoria y concentración; así como (9) problemas del habla (página web de la Sociedad Nacional de EM).

La discapacidad progresiva es el destino de la mayoría de pacientes con EM, especialmente cuando se incluye una perspectiva de 25 años. La mitad de los pacientes con EM requieren un bastón para caminar en un plazo de 15 años desde el comienzo de la enfermedad. La EM es la causa principal de discapacidad neurológica en adultos jóvenes y de mediana edad y, hasta la década pasada, no había tratamientos beneficiosos conocidos. La EM es difícil de diagnosticar debido a los hallazgos clínicos inespecíficos, lo que condujo al desarrollo de criterios de diagnóstico altamente estructurados que incluyen varios avances tecnológicos, que consisten en exámenes de IRM, potenciales evocados y estudios del líquido cefalorraquídeo (LCR). Los criterios de diagnóstico generalmente se basan en los principios generales de las lesiones dispersas en la materia blanca central que se presentan en diferentes momentos y no se explican mediante otras etiologías tales como infección, trastorno vascular o trastorno autoinmune.

La EM se considera generalmente una enfermedad autoinmune mediante la cual un agente o agentes desconocidos desencadenan un ataque inflamatorio mediado por células T, lo que causa la desmielinización de tejido del SNC

(sistema nervioso central). Weiner y col. (2004) Arch Neurol 61:1613-1615. Las pruebas de una reacción autoinmune que se dirige a la mielina son fuertes, pero no definitivas. Hay, por ejemplo, descripciones de apoptosis oligodendrocítica primaria con activación microglial en las lesiones tempranas por esclerosis múltiple en ausencia de linfocitos o fagocitosis de mielina. Manuel y col. (2006) Brain.

5

La EM característicamente se describe como que tiene cuatro patrones de enfermedad: EM recurrente-remitente (EMRR), EM primaria progresiva (EMPP), EM recurrente progresiva (EMRP) y EM secundaria progresiva (EMSP). Se estima que 50 % de los pacientes con EMRR desarrollarán EMSP en 10 años, y hasta 90 % de los pacientes con EMRR finalmente desarrollan EMSP. Cada patrón de enfermedad puede presentarse como leve, moderado o grave.

10 Las personas con EMRR presentan ataques definidos de deterioro de la función neurológica. Estos ataques van seguidos de periodos de recuperación parcial o completa (remisiones), durante los cuales no se produce progresión de la enfermedad (aproximadamente 85 % de las personas se diagnostican inicialmente con EMRR).

La EMPP se caracteriza por un deterioro lento de la función neurológica desde el principio, sin recurrencias o remisiones
15 claras (aproximadamente 10 % de las personas se diagnostican con EMPP). En la EMSP, después de un periodo inicial de EMRR, muchas personas desarrollan un curso de enfermedad secundaria progresivo donde la enfermedad empeora de una forma más constante (aproximadamente 50 % de las personas con EMRR desarrollan esta forma de la enfermedad en un plazo de 10 años). En la EMRP, las personas experimentan síntomas de la enfermedad que empeoran constantemente desde el principio, pero con ataques claros de deterioro de la función neurológica en su
20 transcurso, mientras que la enfermedad parece progresar sin remisiones (5 %) (página web de la Sociedad Nacional de EM). Actualmente no hay cura para la EM, aunque se dispone de varios tratamientos que intentan reducir la actividad de la enfermedad y la progresión de la enfermedad.

En los estados Unidos seis fármacos de cuatro clases están homologados para el tratamiento de la EM. Los
25 tratamientos de la enfermedad homologados por la FDA incluyen los siguientes: clase interferón, IFN-beta-1a (REBIF™ y AVONEX™) e IFN-beta-1b (BETASERON™); acetato de glatiramer (COPAXONE™), un polipéptido; natalizumab (TYSABRI™); y mitoxantrona (NOVANTRONE™), un agente citotóxico. Se han usado otros fármacos con grados variables de éxito, que incluyen corticosteroides, metotrexato, ciclofosfamida, azatioprina e inmunoglobulina intravenosa (IV). Los beneficios de los tratamientos actualmente homologados son relativamente modestos para la
30 tasa de recurrencia y la prevención de la discapacidad en la EM.

REBIF™ (interferón beta 1a) es un medicamento fabricado mediante un procedimiento biotecnológico que produce el mismo interferón beta que el encontrado en el cuerpo humano. REBIF™ se administra, según se informa, tres veces a la semana subcutáneamente. (De la información sobre prescripción homologada por la FDA para REBIF™).

35

AVONEX™ (interferón beta 1a) es un medicamento fabricado mediante un procedimiento biotecnológico que produce el mismo interferón beta que el encontrado en el cuerpo humano. AVONEX™ se administra, según se informa, como una inyección subcutánea una vez a la semana. (De la información sobre prescripción homologada por la FDA para AVONEX™).

40

BETASERON™ (interferón beta 1b) es un medicamento fabricado mediante un procedimiento biotecnológico que produce el mismo interferón beta que el encontrado en el cuerpo humano. BETASERON™ se inyecta, según se informa, subcutáneamente en días alternos. (De la información sobre prescripción homologada por la FDA para BETASERON™).

45

COPAXONE™ (acetato de glatiramer) es una proteína sintética que simula la proteína básica mielina. A través de un mecanismo que no se entiende por completo, este fármaco parece bloquear las células T que dañan la mielina actuando como un señuelo de mielina. COPAXONE™ se inyecta, según se informa, subcutáneamente una vez al día. (De la información sobre prescripción homologada por la FDA para COPAXONE™).

50

TYSABRI™ (natalizumab) es un anticuerpo monoclonal producido en laboratorio. Está diseñado para dificultar el movimiento de células inmunes potencialmente dañinas desde el torrente sanguíneo, a través de la "barrera hematoencefálica", al cerebro y la médula espinal. TYSABRI™ se administra, según se informa, una vez cada cuatro semanas mediante infusión intravenosa. (De la información sobre prescripción homologada por la FDA para
55 TYSABRI™).

NOVANTRONE™ (mitoxantrona) pertenece al grupo general de medicamentos denominados antineoplásicos. Se ha usado para tratar ciertas formas de cáncer. Según se informa, actúa en el tratamiento de la EM suprimiendo la actividad de las células T, las células B y los macrófagos que se supone que conducen al ataque sobre la vaina de
60 mielina. (De la información sobre prescripción homologada por la FDA para NOVANTRONE™).

Las terapias actuales para combatir enfermedades inflamatorias fracasan a la hora de proporcionar una estrategia multicomponente que se dirija a múltiples componentes de la patogénesis. Por ejemplo, muchos tratamientos para las enfermedades autoinmunes implican el direccionamiento a un único componente de la enfermedad, indistintamente bloqueando la proliferación celular o suprimiendo la respuesta inmune con el fin de bloquear la inflamación. Por consiguiente, hay una fuerte necesidad de proporcionar productos terapéuticos eficaces que se dirijan a múltiples componentes de la patogénesis de la enfermedad inflamatoria dirigiéndose a, y modulando, la actividad de la isoforma de la PKC. Los productos terapéuticos específicamente direccionados que son capaces de la inhibición o activación selectiva de isoformas de la PKC específicas son necesarios y proporcionarían una estrategia terapéutica que se dirige a múltiples componentes de la patogénesis de la enfermedad inflamatoria, a la vez que retiene un nivel bajo de efectos secundarios, por ejemplo, cuando se administra tópicamente. Por tanto, el desarrollo de productos terapéuticos que reduzcan la secreción de citoquinas proinflamatorias y/o regulen los inmunomoduladores mediante la modulación de isoformas de la PKC sería beneficioso para aliviar la inflamación tópica y sistémica en general, así como para un huésped de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes como se comenta en el presente documento.

15 En un modelo experimental de encefalitis autoinmune (EAE), la cavtratina inhibió la alteración de la barrera hematoencefálica, la invasión de células CD45+ en el parénquima cerebral y

mejoró los déficits funcionales. Estos datos sugieren que la modulación de la función caveolar podría ser una estrategia terapéutica útil en la esclerosis múltiple.

20 Lesión cerebral traumática (LCT)

La lesión cerebral traumática (LCT) o neurotrauma contribuye a numerosas muertes y casos de discapacidad permanente en los Estados Unidos y a escala mundial. De los 1,4 millones de personas que sufren una LCT cada año en los Estados Unidos, 50 000 morirán, 235 000 serán hospitalizadas y otro 1,1 millón serán tratadas y dadas de alta de un servicio de urgencias. Entre los niños de edad entre 0 y 14 años, en los Estados Unidos, la LCT da como resultado 435 000 visitas al servicio de urgencias cada año, 2685 fallecimientos y 37 000 hospitalizaciones. Langlois y col., Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits, hospitalizations, and deaths, Atlanta (Ga.): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control; 2004.

30 Como se emplea en el presente documento, un “evento neurodegenerativo” significa accidente cerebrovascular, crisis epiléptica, exposición a toxinas, lesión por isquemia/reperfusión, hipoxia, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, lesión de la médula espinal, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia (relacionada con el VIH o no) u otros trastornos neurodegenerativos, así como depresión, esquizofrenia, trastorno obsesivo-compulsivo, anorexia nerviosa y bulimia nerviosa y otros. El término “evento neurodegenerativo” también sirve para abarcar afecciones que dan como resultado daño tisular significativo que están o pueden estar asociados a daño a los nervios del SNP. Los ejemplos ilustrativos incluyen una lesión tópica tal como un golpe, una herida o quemadura, o daño nervioso asociado a un corte o cirugía.

40 Debido a sus propiedades inhibitorias de las proteasas, los agentes de la invención son útiles, p. ej., en el tratamiento o la prevención de una variedad de estados psiquiátricos, psicóticos, neurológicos o vasculares debilitantes, p. ej., de una afección, enfermedad o trastorno del sistema vascular o del sistema nervioso, donde la generación o agregación de beta-amiloide juega un papel, o basados en la inhibición de la BACE-2 (enzima de escisión 2 de la APP en el sitio beta) o la catepsina D, que son homólogos cercanos de las aspartil proteasas de tipo pepsina y la beta-secretasa, y la correlación de la expresión de BACE-2 o catepsina D con un potencial más tumorigénico o metastásico de las células tumorales, como medicamentos anticancerígenos, p. ej., en la supresión del procecimiento metastásico asociado a las células tumorales.

Dicha afección, enfermedad o trastorno del sistema vascular o del sistema nervioso se ejemplifica mediante, e incluye, sin limitación, un trastorno de ansiedad, tal como un trastorno de pánico con o sin agorafobia, agorafobia sin antecedentes de trastorno de pánico, una fobia animal u otra específica, lo que incluye una fobia social, trastorno de ansiedad social, ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo, un trastorno de estrés, que incluye trastorno de estrés postraumático o agudo, o un trastorno de ansiedad generalizada o inducida por sustancias; una neurosis; convulsiones; epilepsia, especialmente convulsiones parciales, convulsiones simples, complejas o parciales que evolucionan a convulsiones secundariamente generalizadas o convulsiones generalizadas [ausencia (típica o atípica), convulsiones mioclónicas, clónicas, tónicas, tónico-clónicas o atónicas]; convulsiones; migraña; un trastorno afectivo, que incluye un trastorno depresivo o bipolar, p. ej., trastorno depresivo mayor de episodio único o recurrente, depresión mayor, un trastorno distímico, distimia, trastorno depresivo NOS, trastorno maniaco bipolar I o bipolar II o trastorno ciclotímico; un trastorno psicótico, que incluye esquizofrenia o depresión; neurodegeneración, p. ej., neurodegeneración generada por isquemia cerebral; un procecimiento degenerativo agudo, traumático o crónico del sistema nervioso, tal como enfermedad de Parkinson, síndrome de Down, demencia, p. ej., demencia senil, demencia

con cuerpos de Lewy o una demencia frontotemporal, un trastorno cognitivo, deterioro cognitivo, p. ej., deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria, una neuropatía amiloide, una neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Gerstmann-Straeussler-Scheinker, enfermedad de Niemann-Pick, p. ej., enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, inflamación cerebral, una lesión cerebral, de la médula espinal o nerviosa, p. ej., lesión cerebral traumática (LCT), un traumatismo nervioso o traumatismo cerebral, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral con amiloidosis, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, o síndrome X frágil; tembladera; angiopatía amiloide cerebral; una encefalopatía, p. ej., encefalopatía espongiiforme transmisible; accidente cerebrovascular; un trastorno de atención, p. ej., trastorno de hiperactividad con déficit de atención; síndrome de Tourette; un trastorno del habla, que incluye tartamudez; un trastorno del ritmo circadiano, p. ej., en sujetos que padecen los efectos del desfase horario o del trabajo a turnos; dolor, nocicepción; sarna; emesis, que incluye emesis aguda, retardada o anticipatoria, tal como emesis inducida por quimioterapia o radiación, mareo por movimiento, o náuseas o vómitos posoperatorios; un trastorno alimentario, que incluye anorexia nerviosa o bulimia nerviosa; síndrome premenstrual; un espasmo muscular o espasticidad, p. ej., en pacientes parapléjicos; un trastorno auditivo, p. ej., tinnitus o deterioro auditivo relacionado con la edad; incontinencia urinaria; glaucoma; miositis por cuerpos de inclusión; o un trastorno relacionado con sustancias, que incluye abuso o dependencia de sustancias, que incluye síndrome de abstinencia de una sustancia,

tal como alcohol. Los agentes de la invención también pueden ser útiles en la mejora cognitiva, p. ej., en un sujeto que padece una afección por demencia, tal como enfermedad de Alzheimer; como premedicación previa a la anestesia o una intervención médica menor, tal como una endoscopia, que incluye endoscopia gástrica; o como ligandos, p. ej., radioligandos o ligandos de tomografía de emisión de positrones (TEP).

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

En diversas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal. En realizaciones específicas, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

El aparato intestinal se ve afectado por muchas enfermedades inflamatorias generalmente agrupadas como enfermedades inflamatorias intestinales. En particular, la enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica grave que afecta a diversos niveles del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, particularmente se puede observar en la última porción del intestino delgado, indistintamente el íleon, el colon o ambos y, en ocasiones, en la membrana mucosa del colon, así como en la región anal.

En la parte intestinal afectada, se produce inflamación, tumefacción y ulceración se produce en toda la pared intestinal, lo que causa estenosis, úlceras sangrantes y dolor, mientras que las porciones de tejido no afectadas parecen normales. La enfermedad de Crohn presenta periodos alternos de síntomas inflamatorios de gravedad variable con síntomas tales como: diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso. De dos tercios a tres cuartos de los pacientes con enfermedad de Crohn requieren cirugía en algún momento de su vida. La cirugía se usa indistintamente para aliviar los síntomas que no responden a la terapia médica o para corregir complicaciones tales como bloqueo, perforación, absceso o hemorragia en el intestino.

Terapias combinadas

Las composiciones útiles en la presente invención están destinadas a ser útiles en los métodos de la presente invención en combinación con uno o más compuestos adicionales útiles para tratar las enfermedades o trastornos contemplados en la invención. Estos compuestos adicionales pueden comprender compuestos de la presente invención o compuestos, p. ej., compuestos comercializados, que se sabe que tratan, previenen o reducen los síntomas de las enfermedades o trastornos contemplados en la invención.

Se puede calcular un efecto sinérgico, por ejemplo, usando métodos adecuados tales como, por ejemplo, la ecuación de $E_{\text{máx}}$ sigmoidal (Holford & Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe & Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326) y la ecuación del efecto medio (Chou & Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55). Cada ecuación mencionada anteriormente se puede aplicar a los datos experimentales para generar una gráfica correspondiente para ayudar a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Las gráficas correspondientes asociadas a las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, el isoblograma y la curva de índice de combinación, respectivamente.

Administración/Dosificación/Formulaciones

El régimen de administración puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. Las formulaciones terapéuticas se

pueden administrar al paciente indistintamente antes o después del comienzo de una enfermedad o trastorno. Además, se pueden administrar varias dosificaciones divididas, así como graduales, diaria o secuencialmente, o la dosis se puede infundir continuamente o puede ser una inyección de bolo. Además, las dosificaciones de las formulaciones terapéuticas se pueden aumentar o reducir proporcionalmente como indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

La administración de las composiciones útiles en la presente invención a un paciente, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, a dosificaciones y durante periodos de tiempo eficaces para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para conseguir un efecto terapéutico eficaz puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad o trastorno en el paciente; la edad, el sexo y el peso del paciente; y la capacidad del compuesto terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Un ejemplo no limitante de un intervalo de dosis efectiva para un compuesto terapéutico de la invención es de aproximadamente 1 a 5000 mg/kg de peso corporal/día. Un experto en la materia será capaz de estudiar los factores relevantes y realizar la determinación en lo que respecta a la cantidad eficaz del compuesto terapéutico sin experimentación excesiva.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares deseados, sin que sea tóxico para el paciente.

En particular, el nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular empleado, el momento de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos o materiales usados en combinación con el compuesto, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y los antecedentes del paciente que se está tratando y factores similares conocidos en la técnica médica.

Un facultativo, p. ej., médico o veterinario, que sea un experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz requerida de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado.

En realizaciones particulares, es especialmente ventajoso formular el compuesto en una forma unitaria de dosificación para su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Formas unitarias de dosificación, como se emplea en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las formas de dosificación unitarias de la invención vienen impuestas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y el efecto terapéutico particular que se desea conseguir y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la composición/formulación de tal compuesto terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente.

En una realización, las composiciones útiles en la invención se formulan usando uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto útil en la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

En una realización, las composiciones útiles en la invención se administran al paciente en dosificaciones que varían de una a cinco veces al día o más. En otra realización, las composiciones útiles en la invención se administran al paciente en un intervalo de dosificaciones que incluye, pero no se limita a, una vez al día, cada dos días, cada tres días a una vez a la semana y una vez cada dos semanas. Resultará fácilmente evidente para un experto en la materia que la frecuencia de administración de las diversas composiciones combinadas útiles en la invención variará de individuo a individuo en función de muchos factores que incluyen, pero no se limitan a, la edad, la enfermedad o trastorno que se va a tratar, el género, la salud general y otros factores. Por tanto, no se debe interpretar que la invención se limita a cualquier régimen de dosificación particular y la dosificación y composición precisas que se van a administrar a cualquier paciente las determinará el facultativo responsable teniendo en cuenta todos los demás factores acerca del paciente.

Los compuestos para administración pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 000 mg, aproximadamente 20 µg a aproximadamente 9500 mg, aproximadamente 40 µg a aproximadamente 9000 mg, aproximadamente 75 µg a aproximadamente 8500 mg, aproximadamente 150 µg a aproximadamente 7500 mg, aproximadamente 200 µg a aproximadamente 7000 mg, aproximadamente 3050 µg a aproximadamente 6000 mg, aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5000 mg, aproximadamente 750 µg a aproximadamente 4000 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3000 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 2500 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 2000 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 75 mg a aproximadamente 900 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 800 mg, aproximadamente 250 mg a aproximadamente 750 mg, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 600 mg, aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg, y cualquiera y todos los incrementos parciales o tales intermedios.

En algunas realizaciones, la dosis de un compuesto es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2500 mg. En algunas realizaciones, una dosis de un compuesto de la invención usado en composiciones descritas en el presente documento es inferior a aproximadamente 10 000 mg, o inferior a aproximadamente 8000 mg, o inferior a aproximadamente 6000 mg, o inferior a aproximadamente 5000 mg, o inferior a aproximadamente 3000 mg, o inferior a aproximadamente 2000 mg, o inferior a aproximadamente 1000 mg, o inferior a aproximadamente 500 mg, o inferior a aproximadamente 200 mg, o inferior a aproximadamente 50 mg. Similarmente, en algunas realizaciones, una dosis de un segundo compuesto (es decir, un fármaco usado para tratar una enfermedad o trastorno) como se describe en el presente documento es inferior a aproximadamente 1000 mg, o inferior a aproximadamente 800 mg, o inferior a aproximadamente 600 mg, o inferior a aproximadamente 500 mg, o inferior a aproximadamente 400 mg, o inferior a aproximadamente 300 mg, o inferior a aproximadamente 200 mg, o inferior a aproximadamente 100 mg, o inferior a aproximadamente 50 mg, o inferior a aproximadamente 40 mg, o inferior a aproximadamente 30 mg, o inferior a aproximadamente 25 mg, o inferior a aproximadamente 20 mg, o inferior a aproximadamente 15 mg, o inferior a aproximadamente 10 mg, o inferior a aproximadamente 5 mg, o inferior a aproximadamente 2 mg, o inferior a aproximadamente 1 mg, o inferior a aproximadamente 0,5 mg, y cualquiera y todos los incrementos totales o parciales de los mismos.

En una realización, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica envasada que comprende un envase que alberga una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, solo o en combinación con un segundo agente farmacéutico; e instrucciones para usar el compuesto para tratar, prevenir o reducir uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un paciente.

Las formulaciones se pueden emplear en mezclas con excipientes convencionales, es decir, sustancias transportadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para administración oral, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea, enteral o de cualquier otro modo adecuado, conocidas en la técnica. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares. También se pueden combinar según se desee con otros agentes activos, p. ej., otros agentes mejoradores de la cognición.

El término "envase" incluye cualquier recipiente para albergar la composición farmacéutica. Por ejemplo, en una realización, el envase es el recipiente que contiene la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el envase no es el recipiente que contiene la composición farmacéutica, es decir, el envase es un recipiente, tal como una caja o un vial que contiene la composición farmacéutica envasada o la composición farmacéutica no envasada y las instrucciones de uso de la composición farmacéutica. Asimismo, las técnicas de envasado son bien conocidas en la técnica. Se debe entender que las instrucciones de uso de la composición farmacéutica pueden estar contenidas en el recipiente que contiene la composición farmacéutica y, como tales, las instrucciones constituyen una relación funcional aumentada con respecto al producto envasado. Sin embargo, se debe entender que las instrucciones pueden contener información relativa a la capacidad del compuesto para realizar su función prevista, p. ej., tratar, prevenir o reducir una

enfermedad o trastorno en un paciente.

- Las vías de administración de cualquiera de las composiciones de la invención incluyen oral, nasal, rectal, intravaginal, parenteral, bucal, sublingual o tópica. Los compuestos para uso en la invención se pueden formular para administración mediante cualquier vía adecuada, tal como para administración oral o parenteral, por ejemplo, transdérmica, transmucosa (p. ej., sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (p. ej., trans- y perivaginalmente), (intra)nasal y (trans)rectal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intrabronquial, por inhalación y tópica.
- 10 Las composiciones y formas de dosificación adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, pastillas, píldoras, cápsulas de gel, pastillas para chupar, dispersiones, suspensiones, soluciones, jarabes, gránulos, perlas, parches transdérmicos, geles, polvos, pelets, magmas, rombos, cremas, pastas, emplastos, lociones, discos, supositorios, aerosoles líquidos para administración nasal u oral, formulaciones en polvo o pulverizadas secas para inhalación, composiciones y formulaciones para administración intravesical y similares. Se debe entender que las
- 15 formulaciones y composiciones que serán útiles en la presente invención no se limitan a las formulaciones y composiciones particulares que se describen en el presente documento.

Administración oral

- 20 Para aplicación oral, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas, líquidos, gotas, supositorios o cápsulas, pastillas y cápsulas de gel. Las composiciones previstas para uso oral se pueden preparar según cualquier método conocido en la técnica y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticos inertes no tóxicos que sean adecuados para la fabricación de comprimidos. Tales excipientes incluyen, por ejemplo, un diluyente inerte tal como lactosa; agentes de granulación y desintegrantes
- 25 tales como almidón de maíz; agentes aglutinantes tales como almidón; y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio.

- Los comprimidos pueden estar sin revestir o se pueden revestir mediante técnicas conocidas con fines de elegancia o para retardar la liberación de los ingredientes activos. Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar
- 30 como cápsulas de gelatina duras donde el ingrediente activo está mezclado con un diluyente inerte.

- Para administración oral, los compuestos pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., almidón de maíz, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (p. ej., glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico). Si se desea, los comprimidos se pueden revestir usando métodos y materiales de revestimiento adecuados tales como los sistemas de revestimiento con película OPADRY™ comercializados por Colorcon, West Point, Pa. (p. ej., OPADRY™ tipo OY, tipo OYC, tipo OY-P orgánicos entéricos, tipo OY-A acuosos entéricos, tipo OY-PM y OPADRY™ blanco, 32K18400). La preparación
- 40 líquida para administración oral puede estar en forma de soluciones, jarabes o suspensiones. Las preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendra, ésteres oleosos o alcohol etílico); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).
- 45

- Las técnicas de granulación se conocen bien en la técnica farmacéutica para modificar polvos u otros materiales particulados de partida de un ingrediente activo. Los polvos se mezclan habitualmente con un material aglutinante para dar aglomerados o gránulos permanentes y que fluyen libremente más grandes denominados una "granulación". Por ejemplo, los procedimientos de granulación por "vía húmeda" que usan disolvente se caracterizan generalmente por
- 50 que los polvos se combinan con un material aglutinante y se humedecen con agua o un disolvente orgánico en condiciones que dan como resultado la formación de una masa granulada húmeda a partir de la cual se debe evaporar a continuación el disolvente.

- La granulación de masa fundida generalmente consiste en el uso de materiales que son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente (es decir, que tienen un intervalo de puntos de plasticidad o fusión relativamente bajo) para favorecer la granulación de materiales en polvo u otros, esencialmente en ausencia de agua u otros disolventes líquidos añadidos. Los sólidos con bajo punto de fusión, cuando se calientan a una temperatura en el intervalo de puntos de fusión, se licúan para actuar como medio aglutinante o de granulación. El sólido licuado se extiende sobre la superficie de los materiales en polvo con los que se pone en contacto y, tras el enfriamiento, forma una masa
- 60 granulada sólida donde los materiales iniciales están unidos entre sí. La granulación de la masa fundida resultante se puede aportar a continuación a una prensa para comprimidos o se puede encapsular para preparar la forma de

dosificación oral. La granulación de la masa fundida mejora la velocidad de disolución y biodisponibilidad de un ingrediente activo (es decir, fármaco) formando una dispersión sólida o solución sólida.

La patente de EE. UU. n.º 5,169,645 desvela gránulos comprimibles directamente que contienen cera que tienen propiedades de fluencia mejoradas. Los gránulos se obtienen cuando las ceras se mezclan en la masa fundida con ciertos aditivos mejoradores de la fluencia, seguido de enfriamiento y granulación de la mezcla. En ciertas realizaciones, solo se funde la propia cera en la combinación fundida de la(s) cera(s) y el(los) aditivo(s), y en otros casos se funden tanto la(s) cera(s) como el(los) aditivos.

10 La presente invención también incluye un comprimido multicapa que comprende una capa que posibilita la liberación retardada de uno o más compuestos de la invención, y una capa adicional que posibilita la liberación inmediata de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Usando una mezcla de cera/polímero sensible al pH, se puede obtener una composición gástrica insoluble donde está encerrado el ingrediente activo, lo que garantiza su liberación retardada.

15 *Administración parenteral*

Para administración parenteral, los compuestos se pueden formular para inyección o infusión, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intramuscular o subcutánea, o para administración en una dosis de bolo y/o infusión continua. Se pueden usar soluciones, suspensiones o emulsiones en un vehículo oleoso o acuoso, que contienen opcionalmente otros agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Formas de administración adicionales

25 Las formas de dosificación adicionales de esta invención incluyen formas de dosificación como se describen en las patentes de EE. UU. n.º 6,340,475, 6,488,962, 6,451,808, 5,972,389, 5,582,837 y 5,007,790. Las formas de dosificación adicionales de esta invención también incluyen formas de dosificación como se describen en las patentes de EE. UU. n.º 2003/0147952, 2003/0104062, 2003/0104053, 2003/0044466, 2003/0039688 y 2002/0051820. Las formas de dosificación adicionales de esta invención también incluyen formas de dosificación como se describen en las solicitudes PCT n.º WO 03/35041, WO 03/35040, WO 03/35029, WO 03/35177, WO 03/35039, WO 02/96404, WO 02/32416, WO 01/97783, WO 01/56544, WO 01/32217, WO 98/55107, WO 98/11879, WO 97/47285, WO 93/18755 y WO 90/11757.

Formulaciones de liberación controlada y sistemas de administración de fármacos

35 En ciertas realizaciones, las formulaciones de la presente invención pueden ser, pero no se limitan a, formulaciones de liberación a corto plazo, de fin de acción rápido, así como de liberación controlada, por ejemplo, liberación prolongada, liberación retardada y liberación pulsátil.

40 El término liberación prolongada se usa en su sentido convencional para hacer referencia a una formulación de fármaco que posibilita la liberación gradual de un fármaco a lo largo de un periodo de tiempo prolongado y que puede, aunque no necesariamente, dar como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. El periodo de tiempo puede ser tan largo como un mes o más y debe ser una liberación que sea más larga que la misma cantidad de agente administrada en forma de bolo.

45 Para la liberación prolongada, los compuestos se pueden formular con un polímero o material hidrófobo adecuado que otorgue propiedades de liberación prolongada a los compuestos. Como tales, los compuestos para uso en el método de la invención se pueden administrar en forma de micropartículas, por ejemplo, mediante inyección o en forma de obleas o discos mediante implantación.

50 En una realización preferida de la invención, los compuestos de la invención se administran a un paciente, solos o en combinación con otro agente farmacéutico, usando una formulación de liberación prolongada.

El término liberación retardada se emplea en el presente documento en su sentido convencional para hacer referencia a una formulación que posibilita una liberación inicial del fármaco después de un cierto retardo tras la administración del fármaco y que puede, aunque no necesariamente, incluir un retardo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 12 horas.

60 El término liberación pulsátil se emplea en el presente documento en su sentido convencional para hacer referencia a una formulación de fármaco que posibilita la liberación del fármaco de tal manera que produce perfiles plasmáticos del fármaco pulsados después de la administración del fármaco.

El término liberación inmediata se emplea en su sentido convencional para hacer referencia a una formulación de fármaco que posibilita la liberación del fármaco inmediatamente después de la administración del fármaco.

5 Como se emplea en el presente documento, a corto plazo se refiere a cualquier periodo de tiempo hasta, y que incluye, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos y cualquiera o todos los incrementos parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

10

Como se emplea en el presente documento, fin de acción rápido se refiere a cualquier periodo de tiempo hasta, y que incluye, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos, y cualquiera o todos los incrementos parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

15

Dosificación

20 La cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto dependerá de la edad, el sexo y el peso del paciente, el estado médico actual del paciente y la progresión de la enfermedad/trastorno en el paciente que se está tratando. El experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas en función de estos y otros factores.

25 Una dosis adecuada de un compuesto de la presente invención puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5000 mg al día, tal como de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, tal como aproximadamente 5 mg a aproximadamente 250 mg al día.

30 La dosis se puede administrar en una dosificación única o en múltiples dosificaciones, por ejemplo, de 1 a 4 o más veces al día. Cuando se usan múltiples dosificaciones, la cantidad de cada dosificación pueden ser la misma o diferente. Por ejemplo, una dosis de 1 mg al día se puede administrar como dos dosis de 0,5 mg, con aproximadamente un intervalo de 12 horas entre dosis.

35 Se entiende que la cantidad de compuesto dosificada al día se puede administrar, en ejemplos no limitantes, cada día, en días alternos, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días o cada 5 días. Por ejemplo, con administración en días alternos, una dosis de 5 mg al día se puede iniciar el lunes con una primera dosis de 5 mg al día posterior administrada el miércoles, una segunda dosis de 5 mg al día posterior administrada el viernes, etc.

40 Los compuestos para uso en el método de la invención se pueden formular en forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para pacientes que se someten a tratamiento, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, opcionalmente en asociación con un vehículo farmacéutico adecuado. La forma de dosificación unitaria puede ser para una dosis diaria única o una de múltiples dosis diarias (p. ej., aproximadamente 1 a 4 veces al día). Cuando se usan múltiples dosis diarias, la forma de dosificación unitaria puede ser la misma o diferente para cada dosis.

45

Los expertos en el material reconocerán, o serán capaces de determinar sin usar más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos, las realizaciones, las reivindicaciones y los ejemplos específicos descritos en el presente documento.

50 Por ejemplo, se debe entender que las modificaciones en las condiciones de reacción, que incluyen, pero no se limitan a, tiempos de reacción, tamaño/volumen de reacción y reactivos experimentales, tales como disolventes, catalizadores, presiones, condiciones atmosféricas, p. ej., atmósfera de nitrógeno, y agentes reductores/oxidantes, con alternativas reconocidas en la técnica y sin usar más que la experimentación rutinaria, están dentro del alcance de la presente solicitud.

55

Se debe entender que donde quiera que se proporcionen valores e intervalos en el presente documento, todos los valores e intervalos abarcados por estos valores e intervalos, están destinados a estar abarcados dentro del alcance de la presente descripción. Asimismo, todos los valores que se encuentran dentro de estos intervalos, así como los límites superiores e inferiores de un intervalo de valores, también están contemplados por la presente solicitud.

60

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente aspectos de la presente invención.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo celular**

5 Se adquirieron células endoteliales vasculares de corazón de rata (RHMVEC) cultivadas de VEC Technologies (Rensselaer, NY) y se hicieron crecer en placas revestidas con fibronectina en medio completo MCDB-131 (VEC Technologies). Las BAEC se aislaron a partir de aortas bovinas obtenidas de un matadero local y se hicieron crecer en DMEM (alto contenido de glucosa, Cellgro) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone) y pen/estrep. Las células
10 endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC) se aislaron localmente a partir de cordones umbilicales humanos y se hicieron crecer en medio M199 (Invitrogen) suplementado con suplemento de crecimiento de células endoteliales (Invitrogen), FBS al 10 %, L-glutamina (Invitrogen) y pen/estrep.

Ejemplo 2: Construcción de biblioteca de fagos T7

15 El sistema de presentación en fago T7select de Novagen se usó para el cribado aleatorio de péptidos que facilitan la absorción de células endoteliales en conjunción con un grupo de oligonucleótidos que codificaban aleatoriamente péptidos 7-mer. Los cebadores peptídicos aleatorios 7-mer que contenían sitios HindIII/XhoI se diseñaron como se indica a continuación:

20 Cebador sentido:

5'-GCTAGAATTCNNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBAAGCTTACTGCAGTAGCATG-3', donde N = A, T, C, G; y B = G, C, T (SEQ ID NO. 9);

25 Cebador antisentido:

5'-CATGCTACTGCAGTAAGCTT-3' (SEQ ID NO. 10).

30 Se mezcló y reasoció una cantidad similar de cada cebador a 95 °C durante 5 minutos, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. Las reacciones de relleno se realizaron a continuación usando la enzima de Klenow para generar fragmentos de ADN con extremos romos. Después de la digestión del HindIII/XhoI, se ligaron 0,06 pmol de insertos al vector T7select415-1b. La reacción de ligadura se añadió directamente a extractos de empaquetamiento de T7 para empaquetamiento in vitro, y se generó una biblioteca de fagos de 3×10^7 ufp.

35 Para la amplificación, la biblioteca se inoculó con cultivo de BL21 (DO₆₀₀ de 0,5-1,0) y se indujo con IPTG 1 mM a 37 °C durante 2 horas hasta que se observó lisis celular. El lisado que contenía fagos se aclaró mediante centrifugación a 8000 x g durante 10 min, el sobrenadante se tituló y las alícuotas se almacenaron a 4 °C.

Ejemplo 3: Selección de fagos mediante endocitosis en CE y amplificación

Se lavaron células endoteliales microvasculares de corazón de rata (RHMVEC) (80 % confluentes; aproximadamente 2×10^7 células/placa de 100 mm) con una solución de tampón fosfato (PBS) y se preincubaron en medio exento de suero a 37 °C durante 30 minutos y se inocularon con un extracto (5×10^9 ufp) de la biblioteca de fagos T7 para
45 alcanzar una multiplicidad de infección (MDI) de 250. Después de incubación durante 1 hora a 37 °C, las células se lavaron con PBS helado y se lavaron con ácido con HCl 0,1 N, pH 2,2, durante 15 segundos para retirar los fagos no unidos y asociados débilmente de la superficie celular.

Las células se tripsinizaron, centrifugaron y lisaron a continuación con agua desionizada estéril en hielo. Los residuos
50 de células se retiraron mediante centrifugación y el sobrenadante que contenía los fagos previamente internalizados se amplificó como se describió anteriormente y se tituló entre rondas para garantizar que se usaban 5×10^9 ufp de fagos de entrada al inicio de cada ronda sucesiva. Después de la finalización de seis rondas de selección/amplificación, se infectaron BL21 de *Eshcherichia Coli* con los fagos resultantes y se emplataron, se escogieron placas individuales, se amplificaron y se secuenciaron.

Ejemplo 4: Síntesis peptídica

Los péptidos, que correspondían a Endo5 (RRPPR) (SEQ ID NO. 1; o Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO. 2), con o sin carga fusionada a sus extremos C-terminales, (DGIWKASFTTFTVTKYWFYR) (SEQ ID NO. 5) se
60 sintetizaron mediante química Fmoc estándar y se analizaron mediante espectrometría de masas para que el centro de recursos biotecnológicos W.M. Keck confirmara su pureza en la Escuela Universitaria de Medicina de Yale. Los

floróforos (carboxifluoresceína para Endo5 y rodamina para AP) se añadieron al N-terminal después de la síntesis.

Antes de cada experimento, los péptidos desecados se pesaron, disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO; J.T. Baker, Philipsburg, NJ) hasta 5×10^{-2} - 10^{-2} M y se diluyeron hasta 10^{-3} M con agua destilada.

5

Ejemplo 5: Liberación de NO

Los experimentos de liberación de NO inducida por VEGF se realizaron como se describió anteriormente. Brevemente, se incubaron BAEC confluentes en DMEM exento de suero durante 6 horas con péptidos. El medio se retiró y se añadió DMEM fresco exento de suero, con o sin VEGF (10^{-9} M) durante 30 minutos. El medio se recogió, las células se tripsinizaron y contaron, y los niveles de nitritos en el sobrenadante se determinaron usando un analizador por quimioluminiscencia de NO de Sievers.

Ejemplo 6: Ensayo de Miles modificado

15

La pérdida de plasma en piel de ratón se estudió usando el ensayo de Miles como se describió anteriormente. Brevemente, se anestesiaron ratones suizos macho (30-35 g) y se inyectaron con azul de Evans (30 mg/kg en PBS; Sigma). Se aplicó fenilisotiocianato (5 % en aceite mineral), un análogo del aceite de mostaza (Pierce, Rockford, Illinois) sobre el oído derecho con una punta de algodón.

20

El oído izquierdo se usó como control y se trató solo con aceite mineral. Después de 30 minutos, los animales anestesiados se sacrificaron, perfundieron, se retiraron los oídos, se secaron y se pesaron. El azul de Evans se extrajo de los oídos con formamida y se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm.

Ejemplo 7: Cuantificación de la internalización

BAEC cultivadas se hicieron crecer en placas de 6 pocillos hasta que se alcanzó la confluencia. Las células se lavaron e incubaron en 1 mL de DMEM que contenía péptidos marcados (10^{-6} M) durante 1, 2, 4 o 6 horas a 37°C , se lavaron tres veces con PBS frío que contenía glicina 0,1 M (pH 4) para retirar la tinción superficial inespecífica.

30

Después de la retirada completa del medio, las células se tripsinizaron, se centrifugaron y se extrajeron las proteínas añadiendo 150 μL de tampón de lisis de SDS o Triton X-100. Las membranas se retiraron mediante centrifugación, y los péptidos internalizados se cuantificaron usando un lector de placas de fluorescencia (Perseptive Biosystems).

35 Las células incubadas con péptidos durante 5 minutos y lavadas como se describió se usaron como tinción superficial basal. La linealidad de ambos fluoróforos usados se determinó realizando una curva de concentración-fluorescencia usando solución de lisis. Los experimentos con cada fluoróforo se realizaron individualmente para prevenir la interferencia cruzada.

Ejemplo 8: Tratamiento de imágenes de PPC de célula endotelial vascular umbilical humana (HUVEC) viva

Se hicieron crecer HUVEC recientemente aisladas en medio M199 suplementado con glutamina, FBS al 10 % y suplemento de crecimiento de células endoteliales sobre placas de Petri con fondo de vidrio. Como los PPC se unen inespecíficamente al vidrio, la fluorescencia de fondo se redujo pretratando las placas de Petri con fondo de vidrio con una solución de bloqueo que contenía AP y Endo5 sin marcar durante 30 minutos (5×10^{-5} M) en medio M199 incoloro con FBS al 1 %.

45

Después de la siembra celular, el medio se retiró y se añadió Endo5 marcado con carboxifluoresceína y AP marcado con rodamina a las células (10^{-5} M) y las células se incubaron a 37°C y CO_2 al 5 % durante 1 hora (pulso). El medio se retiró, las células se lavaron una vez con medio de cultivo caliente y la absorción peptídica se visualizó rápidamente en un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert de Zeiss realizando un apilamiento en Z de las imágenes capturadas seguido de deconvolución volumétrica.

50

(programa Openlab). El medio nuevo se dejó sobre las células durante 2 horas más (3 horas en total) para seguir la localización de los PPC, y se volvieron a visualizar las células (seguimiento).

55

Ejemplo 9: Cribado de biblioteca de fagos para péptidos que median la internalización

de fagos

60

Se generó una biblioteca de presentación en fagos T7 que expresa un promedio de 0,1-1 copias de péptidos 7-mer

generados aleatoriamente sobre la cápsida. Se añadió una cantidad constante de fagos de entrada (5×10^9) a células endoteliales microvasculares de corazón de rata (RHMVEC) cultivadas y estos fagos se seleccionaron por su capacidad para ser rápidamente internalizados (absorción celular) por la monocapa celular.

- 5 Las RHMVEC se incubaron durante 1 hora con $5,0 \times 10^9$ fagos (entrada), se lisaron y los fagos recuperados se cuantificaron (absorción celular) y amplificaron para la siguiente ronda de purificación por afinidad. El porcentaje de recuperación se expresa como la relación de fagos recuperados a fagos de entrada. Como se muestra en la Tabla 1, después de seis rondas de infección/purificación, se observó un aumento de 100 veces en el porcentaje de fagos recuperados, de 0,018 (ronda 1) a 1,8 % (ronda 6) en condiciones de partida idénticas, lo que proporciona pruebas de
- 10 que la biblioteca de fagos resultante presenta propiedades mejoradas de internalización en células endoteliales. Se aislaron 24 fagos individuales.

Tabla 1

Ronda	Fagos de entrada (sobrenadante)	Fagos recuperados (absorción celular)	% de recuperación
1	$5,0 \times 10^9$	$9,4 \times 10^5$	0,018
2	$5,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^6$	0,076
3	$5,0 \times 10^9$	$7,5 \times 10^6$	0. 15
4	$5,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^7$	0,56
5	$5,0 \times 10^9$	$4,5 \times 10^7$	0. 90
6	$5,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^7$	1,8

- 15 Como se muestra en la **FIG. 1**, el análisis de la capacidad de internalización en células endoteliales de la librería de fagos después de cada ronda de selección sugiere un aumento exponencial en el porcentaje de absorción ($R^2 = 0,975$ para la correlación con la función exponencial).

- Después de la finalización de la purificación por afinidad y el enriquecimiento, los fagos resultantes se emplataron, y las placas individuales se amplificaron y secuenciaron. De los 24 fagos individuales aislados, cinco fagos codificaban el inesperadamente corto péptido 5-mer RRPPR (SEQ ID NO. 1), denominado Endo5, que fue el péptido identificado más frecuentemente (21 %).
- 20

- El análisis de codones de la secuencia de ADN del fago codificador de Endo5 reveló la inserción aleatoria e inesperada de un codón de terminación en la secuencia codificadora (CGGCGCCCGCCTCGTTGAGGG) (SEQ ID NO. 8), que justificó el menor tamaño de Endo5 en comparación con el tamaño teórico del PPC de 7 aminoácidos que puede generar esta estrategia.
- 25

Ejemplo 10: actividad inhibidora de la eNOS

- 30 AP-Cav bloquea la actividad de la eNOS inducida por agonistas en células endoteliales cultivadas (Bucci y col., 2000, Nat. Med. 6:1362-7), y esta actividad biológica es dependiente de la internalización de la AP-Cav, la dosificación y el tiempo de pretratamiento. En el estudio descrito en el presente documento, el potencial de absorción de Endo5 se comparó con el de AP ensayando el efecto de Endo5 fusionado a Cav (Endo5-Cav) sobre la liberación de NO por BAEC cultivadas.
- 35

- Las **FIG. 2A-2D** proporcionan diagramas de barras que demuestran que Endo5-Cav (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 5) es más potente que AP-Cav (SEQ ID NO. 2/SEQ ID NO. 5) en el bloqueo de la liberación de NO inducida por VEGF. Remitiéndonos a la **FIG. 2A**, un pretratamiento de seis horas de BAEC con AP o Endo5 sin carga, o con AP-Cav o Endo5-Cav (10^{-5} M), no presentó un efecto significativo sobre la liberación de NO basal (sin estimular) como se ensayó mediante quimioluminiscencia específica del NO. El tratamiento similar con AP o Endo5 no presentó un efecto significativo sobre la liberación de NO inducida por VEGF, mientras que el pretratamiento con AP-Cav (10^{-5} M) bloqueó la actividad del VEGF en 48 % (Bucci y col., 2000, Nat. Med. 6:1362-7). Interesantemente, el pretratamiento similar con Endo5-Cav (10^{-5} M) alteró completamente la actividad del VEGF sobre la liberación de NO en BAEC, lo que
- 45 proporcionó pruebas de que la absorción mediada por Endo5 era más eficaz que la de AP.

- El efecto farmacológico de Endo5-Cav sobre la liberación de NO inducida por VEGF se estudió adicionalmente realizando experimentos de inhibición dependiente de la dosis. Como indica la **FIG. 2B**, el pretratamiento con Endo5-Cav (10^{-6} - 10^{-5} M) causó una inhibición dependiente de la dosis de la liberación de NO inducida por VEGF con un efecto prácticamente máximo a 10^{-5} M. La actividad de AP-Cav alcanzó
- 50

la inhibición máxima a $2,5 \times 10^{-5}$ M debido a la insolubilidad del péptido a una dosis mayor, pero presentó una actividad inhibitoria mucho más débil (inhibición de 61 %). El análisis de las curvas de dosis-respuesta, seguido de la regresión no lineal (ajuste de curva), reveló que la CE_{50} de AP-Cav y Endo5-Cav eran $1,8 \times 10^{-6}$ y $7,5 \times 10^{-6}$ M, respectivamente.

5 Como la inhibición de Endo5-Cav de la actividad de la eNOS inducida por VEGF fue más robusta que la de AP-Cav a una concentración similar, se realizó una comparación dependiente del tiempo entre el efecto de AP-Cav y Endo5-Cav sobre la actividad de la eNOS. Como muestra la **FIG. 2C**, AP-Cav (10^{-5} M) presentó un efecto dependiente del tiempo sobre la liberación de NO inducida por VEGF en BAEC, aunque se observa una diferencia menor entre los momentos de incubación a 4 h y 6 h (57 % frente a 49 %, respectivamente), lo que sugiere que se puede alcanzar un equilibrio prácticamente completo entre absorción de AP-Cav y degradación/eliminación intracelular.

15 El efecto inhibitorio de Endo5-Cav también fue dependiente del tiempo, pero más robusto, con una inhibición completa de la eNOS a las 4 horas, lo que sugiere una internalización más rápida del Endo5. Asimismo, los datos indicaron que un pretratamiento de seis horas con AP-Cav (10^{-5} M) tenía un efecto similar sobre la liberación de NO inducida por VEGF, en comparación con un pretratamiento de dos horas con Endo5-Cav a una concentración similar, lo que proporcionó pruebas de que la tasa de absorción de Endo5-Cav era aproximadamente tres veces la de AP-Cav, como indica la **FIG. 2C**.

20 El dominio AB de la Cav (aminoácidos 82-95 de la caveolina-1 humana; SEQ ID NO. 6) media la inhibición de la eNOS. Bematchez y col. 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. 102:761-66. Como Endo5 parece más potente que AP a la hora de favorecer la internalización de la carga, tanto la secuencia líder como la de la carga de AP-Cav se modificaron con el fin de maximizar el efecto terapéutico/la relación de tamaño en comparación con AP-Cav. Por tanto, se sintetizó Endo5-CavAB (un péptido 19-mer) y su actividad se comparó con la de AP-Cav (un péptido 36-mer).

25 La **FIG. 2D** muestra que el pretratamiento de BAEC durante seis horas con Endo5-CavAB (10^{-5} M) bloqueó por completo la liberación de NO inducida por VEGF, mientras que AP-Cav inhibió el efecto del VEGF en solo 52 % a una dosis similar. Interesantemente, el pretratamiento con Endo5-CavAB (2×10^{-6} M) presentó un efecto similar a AP-Cav (10^{-5} M), inhibiendo la liberación de NO inducida por VEGF en 49 %.

30 En conjunto, estos datos sugieren la viabilidad de optimizar tanto la secuencia de absorción celular de AP-Cav como la carga para maximizar el potencial terapéutico por molécula o por aminoácido.

35 **Ejemplo 11: Propiedades antiinflamatorias**

La producción de NO derivado de CE juega un papel activo en la inflamación, favoreciendo en parte el aumento en la presión intracapilar y la posterior permeabilidad vascular. El pretratamiento de ratones con AP-Cav bloquea la pérdida vascular en el ensayo de Miles (Bucci y col., 2000, Nat. Med.

40 6:1362-7; Bernatchez y col., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:761-6). Este modelo consolidado puede ser, por tanto, una herramienta valiosa para evaluar la potencia *in vivo* de los péptidos fusionados a Endo5. Las **FIG. 3A y 3B** demuestran que Endo5-Cav (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 5) bloquea la extravasación de azul de Evans *in vivo*.

45 Remitiéndonos a la **FIG. 3A**, un pretratamiento de una hora de ratones con AP-Cav (1 mg/kg) atenuó en 37 % (n = 6 por grupo), en comparación con el AP solo (dosis similar en términos de peso molecular). Endo5-Cav inhibió la pérdida vascular inducida por aceite de mostaza en 58 %, en comparación con el pretratamiento con Endo5 solo (n = 6 u 8 por grupo), y presentó una actividad inhibitoria mayor que AP-Cav estadísticamente significativa ($\dagger P < 0,05$).

50 La gráfica mostrada en la **FIG. 3B** indica que tanto AP-Cav como Endo5-Cav atenúan la extravasación de azul de Evans en la piel y el tejido del oído en comparación con los péptidos de control, aunque Endo5-Cav fue más potente. Sin pretender ceñirnos a ninguna teoría, la inhibición incompleta presentada por Endo5-Cav de la inflamación inducida por aceite de mostaza se puede explicar mediante la observación de que el NO solo juega un papel parcial en la mediación de la permeabilidad vascular en este modelo (Bucci y col., 2000, Nat. Med. 6:1362-7).

55 **Ejemplo 12: Internalización por células endoteliales**

60 El AP es un PPC que atraviesa la membrana de las neuronas. Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-8. Como se comentó en otra parte del presente documento, se encontró inesperadamente que Endo5 favorecía la alta internalización de fagos en células endoteliales, y se encontró inesperadamente que Endo5-Cav era más potente que AP-Cav en la prevención de la activación de la eNOS y la permeabilidad vascular.

En el estudio descrito en el presente documento, la tasa de internalización de Endo5 se comparó directamente con la de AP usando la forma marcada con carboxifluoresceína y rodamina de cada péptido, respectivamente. La linealidad de cada péptido acoplado al fluoróforo se confirmó realizando una curva de concentración/fluorescencia estándar.

5 **Las FIG. 4A-4B** son gráficas que ilustran el hallazgo de que Endo5 (SEQ ID NO. 1) se internaliza más rápido que AP (SEQ ID NO. 2) en células endoteliales cultivadas. Remitiéndonos a la **FIG. 4A**, la calibración se realizó con el fin de obtener valores de absorbancia similares para ambos fluoróforos (ajustando los ajustes de ganancia para cada fluoróforo). Las BAEC se incubaron individualmente con péptidos marcados con fluoróforo (10^{-6} M) durante 1, 2, 4 o 6 horas, se lavaron con ácido, se lisaron y se determinó la absorción peptídica total cuantificando la fluorescencia.

10

Se observó un aumento lineal en la internalización de AP con el tiempo, como indica la **FIG. 4B**, con un máximo a las 6 horas a un valor de $1,07 \times 10^{-9}$ moles de AP/ 10^6 células. Esto indica que aproximadamente 11 % de la cantidad total de rodamina-AP añadida en el tiempo cero es internalizada por una monocapa de BAEC confluentes en las instalaciones, lo que proporciona pruebas de un mecanismo de concentración activo. La tasa de internalización de carboxifluoresceína-Endo5 fue mayor que la de AP, también con un máximo a las 6 horas con un valor de $2,85 \times 10^{-9}$ moles de Endo5/ 10^6 células, lo que sugiere que 30,5 % del péptido añadido se internalizó después de 6 horas, como indica la **FIG. 4B**.

15

Ejemplo 13: Internalización en células endoteliales vivas

20

En estudios anteriores que intentaron arrojar luz sobre los mecanismos de absorción implicados en la entrada de PPC en las células, el tratamiento de imágenes se realizó en células fijadas. Los resultados de estos estudios pueden no ser fiables a la vista de las crecientes pruebas de que la fijación celular conduce a la inesperada translocación nuclear de PPC. Richard y col., 2003, J. Biol. Chem. 278:585-90.

25

En el presente estudio, los experimentos de microscopía de epifluorescencia se realizaron en HUVEC vivas para comparar el mecanismo de absorción de Endo5 y AP. Después de bloquear placas de Petri con fondo de vidrio con AP y Endo5 sin marcar para minimizar la unión inespecífica de péptidos marcados, se hicieron crecer HUVEC recientemente aisladas hasta confluencia de 50 % y se marcaron con un "pulso" de carboxifluoresceína-Endo5 y rodamina-AP (10^{-6} M) durante 1 h, se lavaron, seguido de un "seguimiento" de dos horas durante un total de 3 horas.

30

Las imágenes deconvolucionadas se capturaron después de los periodos de "pulso" y "seguimiento". **Las FIG. 5A- 5C** ilustran que la internalización de Endo5 (SEQ ID NO. 1) y AP (SEQ ID NO. 2) usa rutas celulares solapadas en las células endoteliales. Tanto Endo5 (canal verde, izquierda) como AP (canal rojo, centro) presentan tinción citoplásmica punteada difusa en HUVEC vivas después de 1 h de incubación a 37 °C (**FIG. 5A**). La tinción nuclear estuvo ausente prácticamente por completo (área central oscura). Interesantemente, las imágenes fusionadas revelaron un alto grado de colocalización entre

35

Endo5 y AP (**FIG. 5A**, derecha). Esta observación sugiere similitud entre las rutas de internalización temprana de Endo5 y AP. La incubación individual de HUVEC con rodamina-AP causó poca o ninguna señal en el canal de carboxifluoresceína-Endo5 y viceversa, lo que sugiere la ausencia de exudación significativa.

40

Después de un periodo de "seguimiento" de dos horas en ausencia de PPC, la tinción punteada para tanto Endo5 como AP todavía era evidente, pero presentaba un patrón más concentrado que difuso, lo que destaca un mecanismo activo de concentración/localización intracelular (**FIG. 5B**, izquierda). Las imágenes fusionadas (panel derecho) revelan nuevamente colocalización entre Endo5 y AP durante esta fase de concentración peptídica intracelular a largo plazo (seguimiento) después de la internalización inicial desde la superficie celular. Se mostraron las células representativas. En conjunto, estos datos ilustran la similitud de la internalización y la distribución intracelular entre Endo5 y AP.

50

La similitud de las rutas de internalización entre Endo5 y AP se confirmó realizando estudios competitivos y cuantificando la capacidad de Endo5 y AP para favorecer la entrada de carga en las células. Remitiéndonos a la **FIG. 5C**, el efecto parcial de AP-Cav (10^{-5} M) sobre la liberación de NO inducida por VEGF se bloqueó mediante pretratamiento con indistintamente AP o Endo5 (5×10^{-5} M). La inhibición prácticamente completa de la liberación de NO inducida por VEGF mediada por Endo5-Cav se impidió parcialmente mediante el pretratamiento con indistintamente AP o Endo5 (5×10^{-5} M)

55

Como muestra la **FIG. 5C**, la inhibición de 91 % de la liberación de NO inducida por VEGF por Endo5-Cav fue impedida por AP (inhibición de 30 %) o Endo5 (inhibición de 13 %). En conjunto, estos resultados sugieren que AP y Endo5 se internalizan a través de rutas similares en CE.

60

Ejemplo 14: Tratamiento de la uveítis

Análisis de la cavtratina en inyección intravítrea en el modelo de rata de neovascularización inducida por láser. En este modelo, la cavtratina se administró dos veces en intervalos de 4 días con evaluación en el día 8. Los resultados de este estudio se proporcionan en la **FIG. 6**.

Los animales B10.RIII (Jackson Laboratories) se inmunizan con péptido IRBP₁₆₁₋₁₈₀ humano en el día 0 y se tratan con el fármaco experimental mediante inyección intraperitoneal (IP) de péptidos formulados en solución salina diariamente desde los días 7-19. En el día 19, el máximo de inflamación mediante puntuación histopatológica, los animales se sacrificaron y los ojos se fijaron y procesaron para tinción con hematoxilina y eosina (H&E). El grado de UAE se evalúa mediante puntuación histopatológica de la retina, y las secciones retinianas son evaluadas de una forma enmasacarada por titulados experimentados.

Los animales se tratan en grupos de 6, con ambos ojos procesados para histopatología y puntuados para un n de 12 ojos por grupo. Este número de animales/ojos proporciona un poder estadístico para detectar una diferencia entre el grupo experimental y el control sin tratar cuando la puntuación histopatológica del grupo experimental es la mitad del valor del grupo de control (intermedio entre el control sin tratar y los animales no inmunizados). Se califica un grupo inicial de animales para confirmar la varianza y validar los tamaños de muestra.

Las cohortes de animales se tratan/evalúan a continuación para hacer posibles las comparaciones siguientes:

(1) Tratamiento con cavtratina (2,5 mg/kg) frente a control sin tratar. Esto confirma que la inhibición de la función de la caveolina mejora la inflamación. El tratamiento se considera un éxito si hay una diferencia entre las puntuaciones histopatológicas de los dos grupos. Si hay una diferencia grande entre grupos que no es estadísticamente significativa, se considera aumentar el número para conseguir significancia. Si hay una diferencia de al menos 25 % entre los valores medios, pero no una significancia estadística, el experimento se repite con dosis superiores de cavtratina.

(2) Tratamiento con Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) (curva de dosis-respuesta, usando dosis de 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg) frente al control sin tratar. Si la dosis de 0,3 mg/kg produce un efecto que no es estadísticamente diferente del control sin inmunizar, se usan dosis inferiores, en el orden de 0,1, 0,03, 0,01 mg/kg hasta que el nivel del efecto es diferente de la puntuación de los animales de control sin inmunizar. El estudio finaliza cuando se identifica la dosis de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) que produce el efecto máximo.

(3) Tratamiento con la dosis óptima de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) frente a un péptido de control que contiene solo el fragmento de penetración celular del péptido. Este grupo sirve para confirmar los experimentos de dosis-respuesta. Una vez que se identifica la dosis óptima de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6), se realiza una comparación de la dosis óptima de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) frente a cavtratina y frente al control sin tratar. Esta última comparación se repite con la fijación para inmunohistoquímica y los ojos se tiñen con CD45 anti-ratón y se cuantifica la invasión de la retina con células CD45+.

Para establecer que la modulación de la función caveolar mejora la UAE cuando se administra intravítreamente, se usa un modelo de UIE de conejo. Este modelo de UIE causa tanto inflamación de la cámara anterior como daño retiniano, y se puede puntuar para histopatología retiniana similar a un modelo de UAE de ratón.

Antes de ensayar Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) en el modelo de conejo, se realiza una evaluación del potencial ocular y la toxicidad retiniana mediante administración IVT. La dosis inferior se elige como equivalente a la concentración óptima identificada en el ratón suponiendo la distribución libre en el ratón y la distribución libre en el ojo de conejo.

Esta dosis y dosis de 10 y 30 veces más se inyectan intravítreamente en conejos y las retinas se retiran, fijan y procesan para H&E. Se realizaron tanto estudios agudos (retinas tomadas 24 horas después de una única administración IVT) como estudios crónicos (animales inyectados diariamente durante 7 días). Para conservar animales, se evalúan dos animales (cuatro ojos) por grupo (total de 12 animales). Las secciones retinianas son evaluadas por un histopatólogo retiniano experimentado.

Se determina que Endo5-CavAB (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO. 6) no es tóxica si hay una falta de efecto observable a la dosis óptima y si es posible la identificación de un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) y la definición del efecto adverso observado a dosis altas. Si la dosis más alta ensayada es un NOAEL, no se ensayan dosis superiores.

Se determina que Endo5-CavAB (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO. 6) para inhibir la inflamación retiniana se demuestra usando el procedimiento experimental siguiente. Para los experimentos de UIE, el Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ

ID NO. 6) inyectado se elige en base a la curva de dosis-respuesta de UEA de ratón combinada con los experimentos de toxicidad y farmacocinética. La concentración objetivo de fármaco en el vítreo es la concentración alcanzada en el experimento de UEA (suponiendo la distribución libre en el ratón) a dosificaciones que usan la dosis mínima totalmente eficaz de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6). La dosis vítrea se ajusta usando los datos farmacocinéticos para alcanzar la concentración objetivo, pero no una concentración tóxica, y se ajusta el intervalo entre dosis.

La dosis vítrea y el intervalo elegido es uno que proporciona concentraciones vítreas continuas por encima de la concentración objetivo, pero no alcanza la concentración tóxica.

10 Se determina que Endo5-CavAB (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO. 6) se administra empezando en el día de la inducción de la uveítis como dicta lo anterior hasta el día 6 posinducción. En el día 6, los animales se sacrifican y los ojos se procesan para análisis histopatológico. Las secciones son evaluadas de forma enmascarada por titulados experimentados. Este experimento se realiza con cohortes de 6 animales, cada uno con uveítis inducida unilateralmente mediante inyección intravítrea de antígeno.

15 Los animales/ojos con uveítis y administración intravítrea simulada de fármaco se comparan con animales que recibieron Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6). Este experimento se repite dos veces.

Experimentos con modelo de conejo:

20 Toxicología en conejos. El objetivo de esta serie es garantizar que el propio fármaco no está produciendo ningún efecto tóxico en los animales que podría interferir con el modelo de uveítis. Un objetivo secundario sería establecer que dosis superiores a las que estamos usando no tienen un efecto tóxico y que hay una ventana terapéutica.

25 Se ensayan 3 dosis del fármaco en la concentración de uso prevista y 3 veces superior y 10 veces superior. Cada animal se inyecta con fármaco en un solo ojo. Se realizan dos inyecciones de fármaco que simulan la administración prevista en los estudios de eficacia; la primera inyección en el día 0 y la segunda en el día 3. Para cada dosis, se evalúan dos momentos, el día 4 (un día después de la segunda inyección) y día 6 (3 días después de la segunda inyección). Todos los animales se examinan clínicamente en los días 1, 3 (antes de la segunda inyección), 4 (para los

30 animales que se van a sacrificar a los 4 días) y 6. Después del examen clínico, se toma sangre y se almacena para su análisis FC posterior, y los animales se sacrifican y los ojos se fijan y procesan para histopatología. Todos los ojos tratados se seccionan y tiñen (H&E) y los tejidos (que incluyen el segmento anterior y la retina) son examinados por un histopatólogo ocular experimentado.

Ensayos de eficacia

Se realiza el modelo de uveítis para los protocolos existentes en el laboratorio Rosenbaum/Lin. Solo se inyecta un ojo con inmunógeno para inducir la uveítis y solo se inyecta ese ojo con fármaco. Se ensayan al menos dos dosis del fármaco intravítreamente. En cada dosis, el fármaco se administra en el día 0 y día 3, con sacrificio en el día 6. Las variables (primarias) son las células y la proteína en el acuoso con puntuación clínica como una secundaria. Las células se cuentan indistintamente usando un contador celular (contador Coulter) o usando un hemocitómetro.

Se realiza un examen clínico final en el Día 6, se toma una muestra de sangre para almacenamiento para FC posterior, y se sacrifica el animal. Se toma el ojo experimental para su análisis. Todos los ojos tratados se seccionan y tiñen (H&E) y los tejidos (que incluyen el segmento anterior y la retina) son examinados por un histopatólogo ocular experimentado.

Los animales se ensayan en grupos de 6 por dosis y se sacrifican para su análisis en un único momento. Dado un grupo de control, un grupo de cavtratin y dos dosis de Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) y al menos un grupo confirmatorio, se necesita un mínimo de 30 animales para esta fase, con 30 ojos seccionados, teñidos y evaluados.

Ejemplo 15: Tratamiento de la lesión cerebral traumática (LCT)

55 Se reconoce desde hace tiempo que la lesión cerebral traumática, que incluye lesiones en la cabeza tanto penetrantes como cerradas, así como lesiones a la médula espinal, tiene un componente inflamatorio. Véase, p. ej., Hernández-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Frontiers in neurology*. 2013; 4:30 doi: 10.3389/fneur.2013.00030. PubMed PMID: 23531681; PubMed Central PMCID: PMC3607801.

60 La caveolina y sus análogos tienen la capacidad de reducir el edema y la infiltración de células inflamatorias, y también

pueden suprimir la activación de la microglía/los macrófagos. Los efectos de los análogos de la caveolina se pueden demostrar en un modelo de lesión cerrada en la cabeza. El modelo de impacto cortical controlado ha demostrado que da como resultado efectos inflamatorios a plazo tanto corto como largo. Véase Acosta SA, y col. Long-term upregulation of inflammation and suppression of cell proliferation in the brain of adult rats exposed to traumatic brain injury using the controlled cortical impact model. *PLoS one*. 2013; 8(1):e53376. doi: 10.1371/journal.pone.0053376. PubMed PMID: 23301065; PubMed Central PMCID: PMC3536766.

Las ratas Spague Dawley (10 semanas de edad) se anestesian usando isoflurano al 1-2 % y se fijan en un armazón estereotáctico. El cráneo se expone quirúrgicamente y se realiza una craneotomía de 2,5 mm de radio centrada en las coordenadas -0,2 mm anterior y +0,2 mm lateral a la línea central en la corteza frontoparietal. Se usa un impactador cortical controlado (Pittsburgh Precision Instruments. Inc., Pittsburgh, PA) para producir un impacto usando una velocidad de 6,0 m/s y una profundidad de 1,0 mm por debajo de la duramadre y una duración del impacto de 150 ms. El impactador se angula para que impacte en el cráneo perpendicularmente al cerebro en el punto de impacto. Los animales se mantienen a la temperatura corporal normal durante el procedimiento. Después del impacto, la incisión se sutura y se permite que los animales se recuperen.

Los déficits neurológicos se puntúan usando el sistema de Clark evaluados 24 y 48 horas posesión. Véase, Clark W. y col., Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1998; 29(10):2136-40. PubMed PM ID: 9756595.

El tratamiento de las ratas con 2,5 mg/kg de cavtratina IP inmediatamente después de la LCT y a las 24 horas después de la LCT reduce los déficits neurológicos observados. A las 48 horas después de la LCT, las ratas se sacrifican y los cerebros se seccionan y el tejido se procesa para inmunohistoquímica. En los animales sin tratar, la expresión de GFAP en la penumbra de la lesión aumenta drásticamente, y el tratamiento con cavtratina reduce la expresión de GFAP. Véase, Glushakov y col., Prostaglandin F2alpha FP receptor antagonist improves outcomes after experimental traumatic brain injury, *Journal of neuroinflammation*. 2013; 10(1): 132. doi: 10.1186/1742-2094-10-132. PubMed PMID:24172576.

Ejemplo 16: Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, son enfermedades inflamatorias del tracto intestinal. Hay muchos modelos de EII y el más popular es el modelo del dextrano sulfato sódico. Véase, p. ej., Koboziev y col., Pharmacological intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases: translating preclinical data into new drug therapies, *Inflammatory bowel diseases*. 2011; 17(5): 1229-45. doi: 10.1002/ibd.21557. PubMed PMID: 21312318; PubMed Central PMCID: PMC307537. Este modelo se usa para demostrar la eficacia de los análogos de la caveolina.

Los ratones C57B1/6 se alimentan con dextrano sulfato sódico al 2 % en agua potable durante 9 días. Los pesos corporales se miden diariamente. Al final de 9 días, los ratones se sacrifican y se somete el primer centímetro distal del colon a análisis histopatológico. Las secciones se puntúan según el sistema de puntuación descrito en Jirkof y col., Burrowing is a sensitive behavioral assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Laboratory animals*. 2013, 47(4):274-83. doi: 10.1177/0023677213493409. PubMed PMID:23828853.

El tratamiento de estos ratones con 2,5 mg/kg de cavtratina o Endo-5CavAB (u otro análogo de la caveolina) IP diariamente comenzando en el día 1 reducirá la pérdida de peso a los 9 días y mejorará la puntuación histopatológica.

Ejemplo 17: Tratamiento de la esclerosis múltiple (EM)

Se reconoce desde hace tiempo que la esclerosis múltiple es una afección inflamatoria y los tratamientos actuales incluyen inmunosupresores tales como esteroides, metotrexato e interferones (Betaseron®, Avonex®, etc.) y más recientemente Gilenya® (Fingolimod).

Los pacientes diagnosticados con EM, que incluye los tipos recurrente remitente y primaria progresiva, se tratan con Endo5-CavAB (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 6) (u otro análogo de la caveolina) a 80 mg al día mediante inyección subcutánea. Este tratamiento mejora los síntomas de EM, lo que incluye función motora, marcha, etc., mejoradas. Los cambios en el paciente que recibe tratamiento se miden usando la Escala Compuesta Funcional de Esclerosis Múltiple. Véase, p. ej., la página web de la Sociedad Nacional de EM: Clinical Study Measures.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eveleth, David ,Sessa, William C.

ES 2 743 622 T3

<120> TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE Y/O INFLAMATORIA USANDO MODULADORES DE CAVEOLINA NOVEDOSOS

<130> 120015-001US1

5

<150> US 61/909,005

<151> 26/11/2013

<160> 23

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

20

<400> 1

Arg Arg Pro Pro Arg
1 5

<210> 2

25

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

30

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 178

35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val
1 5 10 15

Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met
20 25 30

Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu
35 40 45

Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val
50 55 60

ES 2 743 622 T3

Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser
65 70 75 80

Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
85 90 95

Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala
100 105 110

Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp
115 120 125

Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile
130 135 140

Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe
145 150 155 160

Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys
165 170 175

Glu Ile

- <210> 4
- <211> 151
- 5 <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus
- <400> 4

ES 2 743 622 T3

Met Met Ala Glu Glu His Thr Asp Leu Glu Ala Gln Ile Val Lys Asp
 1 5 10 15

Ile His Cys Lys Glu Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys Asn Ile
 20 25 30

Asn Glu Asp Ile Val Lys Val Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro
 35 40 45

Val Gly Thr Tyr Ser Phe Asp Gly Val Trp Lys Val Ser Tyr Thr Thr
 50 55 60

Phe Thr Val Ser Lys Tyr Trp Cys Tyr Arg Leu Leu Ser Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Gly Val Pro Leu Ala Leu Leu Trp Gly Phe Leu Phe Ala Cys Ile Ser
 85 90 95

Phe Cys His Ile Trp Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Tyr Leu Ile
 100 105 110

Glu Ile Gln Cys Ile Ser His Ile Tyr Ser Leu Cys Ile Arg Thr Phe
 115 120 125

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

Val Val Leu Arg Lys Glu Val
 145 150

<210> 5
 5 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr
 1 5 10 15

10 Trp Phe Tyr Arg
 20

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 743 622 T3

Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 15
 5 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> artificial
 10
 <400> 7
 cggcgcccgc ctcgt 15

 <210> 8
 15 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> artificial

 <400> 8
 cggcgcccgc ctcggtgagg g 21

 25 <210> 9
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Sense primer

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (11)..(13)
 <223> n is a, c, g, or t

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (15)..(16)
 <223> n is a, c, g, or t

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (18)..(19)
 <223> n is a, c, g, or t

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g, or t

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (24)..(25)
 <223> n is a, c, g, or t

 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 743 622 T3

<222> (27)..(28)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>

5 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 9

10 gctagaattc nnnbnnbnnb nbnbnbnbn nbaagcttac tgcagtagca tg 52

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> Anti-sense primer

20 <400> 10

catgctactg cagtaagctt 20

<210> 11

<211> 44

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Thr Ser Arg Val Tyr Ser Ile
 1 5 10 15

Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe Glu Ala Val Gly Lys Ile
 20 25 30

Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Leu Gln Ile
 35 40

30 <210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

35 <400> 12

Asp Glu Val Trp Arg Val Ser Tyr Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr
 1 5 10 15

Trp Cys Tyr Arg
 20

<210> 13

<211> 22

40 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

ES 2 743 622 T3

Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile Ser His Ile Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Cys Ile Arg Thr Phe Cys
20

<210> 14
<211> 13
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr Trp Phe Tyr Arg
1 5 10

10 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 15

Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr
1 5

<210> 16
<211> 7
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16

Ala Thr Thr Phe Thr Val Thr
1 5

25 <210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 17

Phe Thr Thr Phe Ala Val Thr
1 5

<210> 18
35 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18

Phe Thr Thr Phe Thr Ala Thr
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens

ES 2 743 622 T3

<400> 19

Phe Thr Thr Phe Thr Val Ala
1 5

5 <210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido de control aleatorizado Cav-X

<400> 20

Trp Gly Ile Asp Lys Ala Phe Phe Thr Thr Ser Thr Val Thr Tyr Lys
1 5 10 15

Trp Phe Arg Tyr
20

15
<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

20
<400> 21

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 22
25 <211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> Péptido de fusión al dominio de andamiaje Antennapedia-caveolina-1

<400> 22

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr
20 25 30

Trp Phe Tyr Arg
35

35 <210> 23
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>

ES 2 743 622 T3

<223> Péptido de fusión Antennapedia-cav-X

<400> 23

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Trp Gly Ile Asp Lys Ala Phe Phe Thr Thr Ser Thr Val Thr Tyr Lys
20 25 30

Trp Phe Arg Tyr
35

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende un resto de carga enlazado a un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO. 1), donde el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto.
2. La composición para uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad o afección inflamatoria es uveítis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, lesión cerebral traumática o enfermedad inflamatoria intestinal.
3. La composición para uso de la reivindicación 1, donde el péptido transportador que comprende la SEQ ID NO. 1 está codificado por la SEQ ID NO: 7 de ácido nucleico.
4. Una composición que comprende un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende un resto de carga enlazado a un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO. 1), donde el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6 para uso en el tratamiento de un sujeto necesitado mediante entrega de un resto de carga a, o al interior de, una célula diana.
5. La composición para uso de la reivindicación 4, donde la célula diana comprende una célula endotelial, una célula cardíaca, una célula del músculo esquelético o una célula cerebral.
6. Una composición que comprende un constructo transportador, donde el constructo transportador comprende un resto de carga enlazado a un péptido transportador que comprende la secuencia de aminoácidos RRPPR (SEQ ID NO. 1), donde el resto de carga es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 3-6 para uso en la entrega de un resto de carga a, o al interior de, una célula diana de un sujeto con necesidad del mismo.
7. La composición para uso de cualquier reivindicación anterior, donde la composición se administra mediante al menos una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, oral, inhalatoria, rectal, vaginal, transdérmica, intranasal, bucal, sublingual, parenteral, intratecal, intragástrica, oftálmica, pulmonar y tópica.
8. La composición para uso de cualquier reivindicación anterior, donde la composición se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 5; SEQ ID NO. 1-SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 3-SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 4-SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 5-SEQ ID NO. 1; y SEQ ID NO. 6-SEQ ID NO. 1.

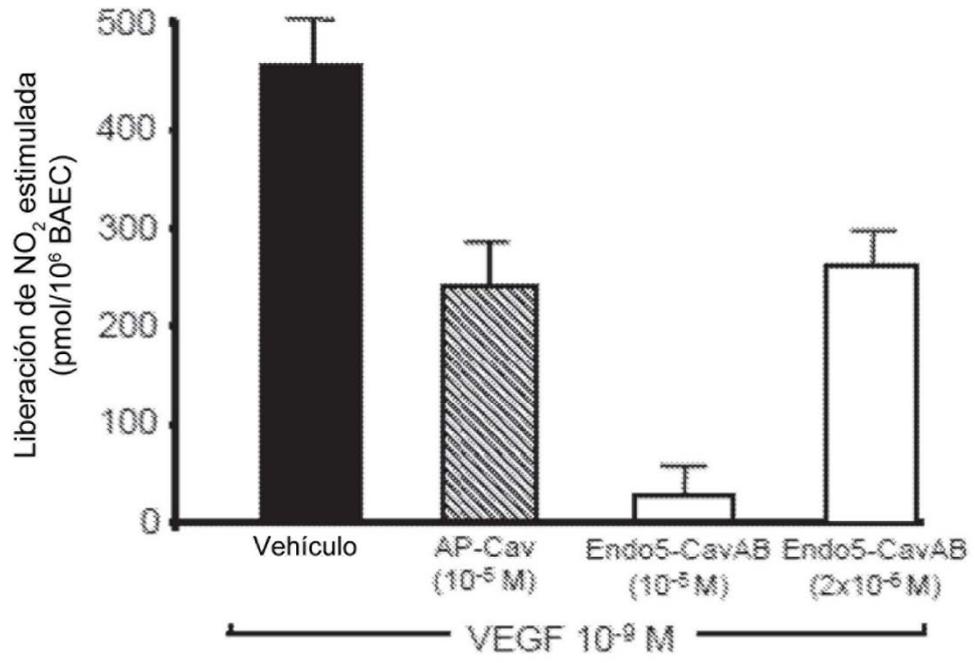


FIG. 1

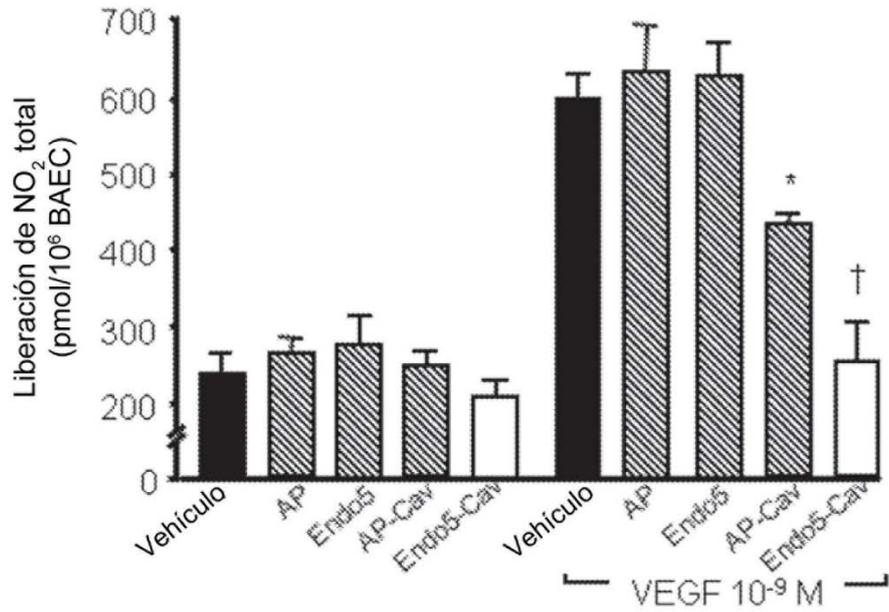


FIG. 2A

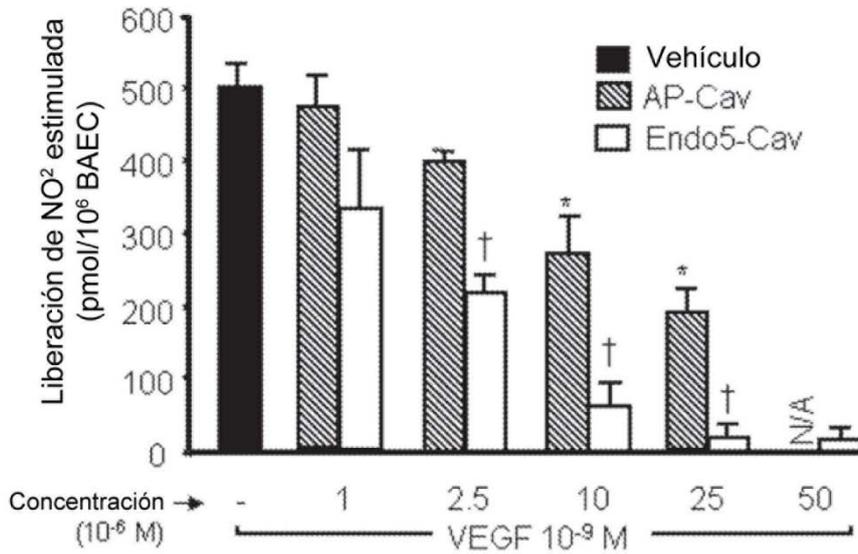


FIG. 2B

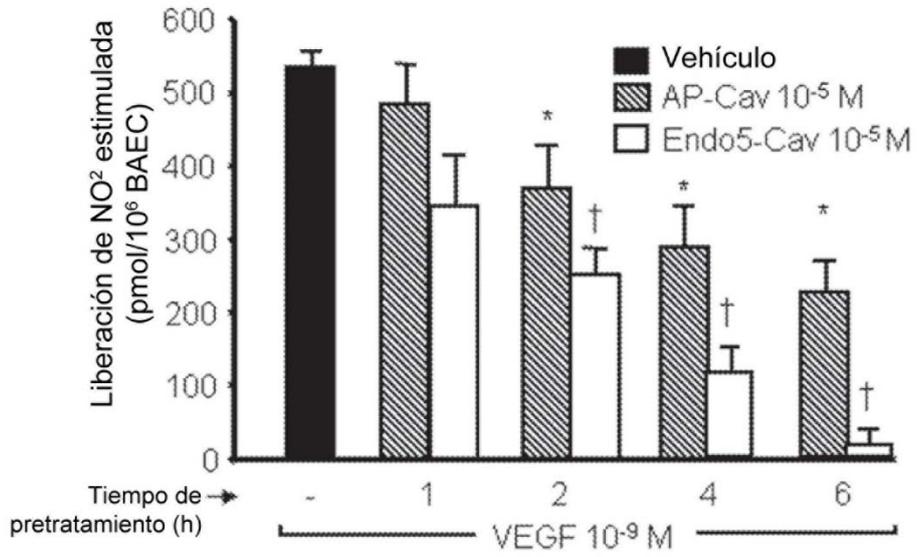


FIG. 2C

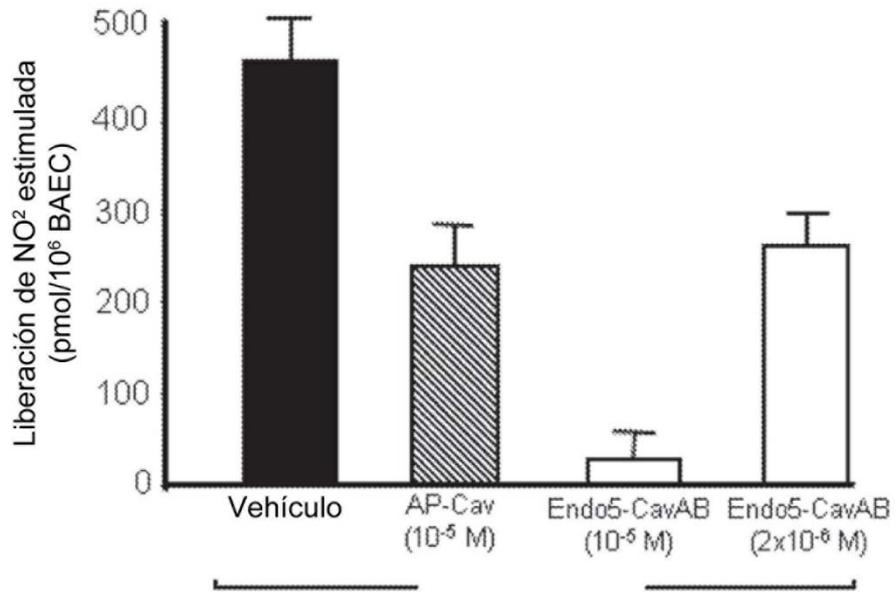


FIG. 2D

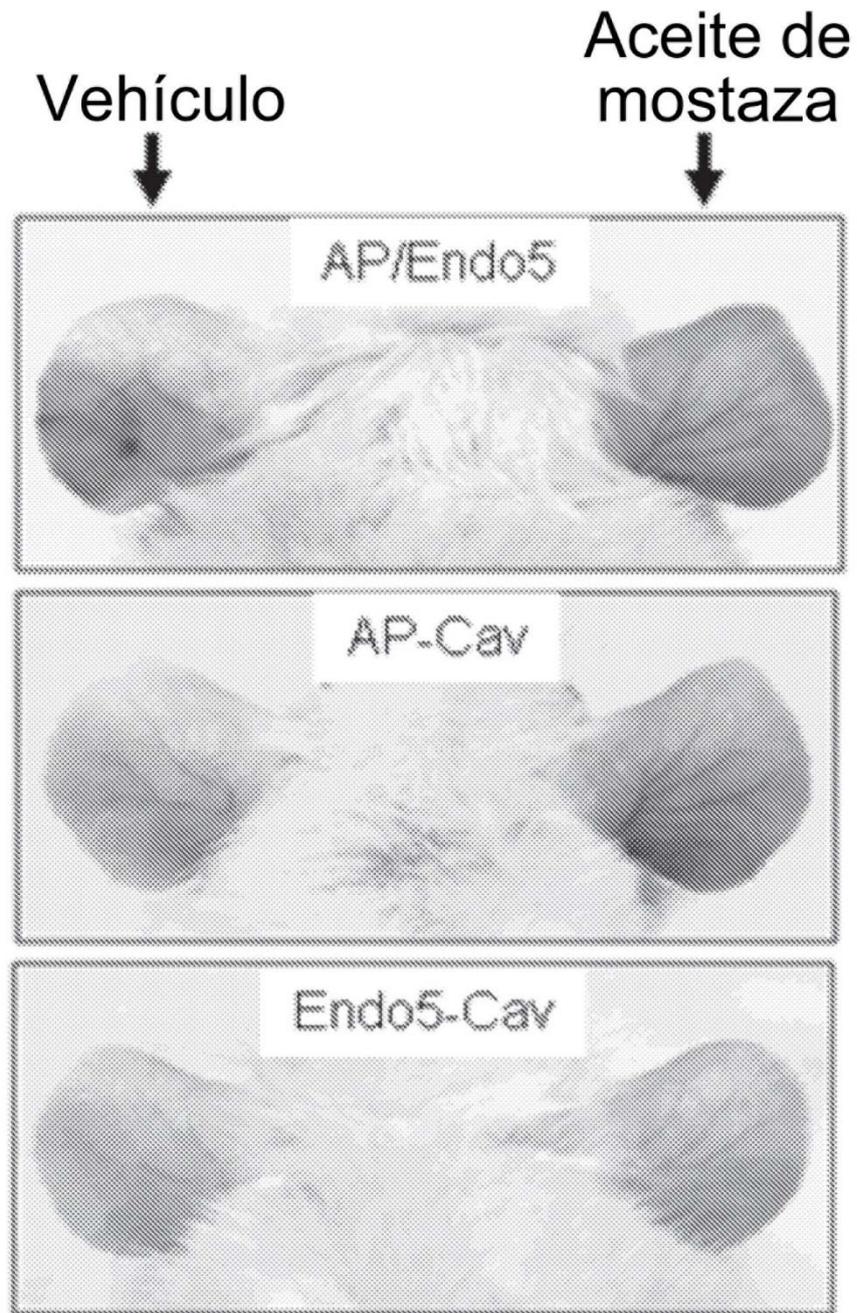


FIG. 3A

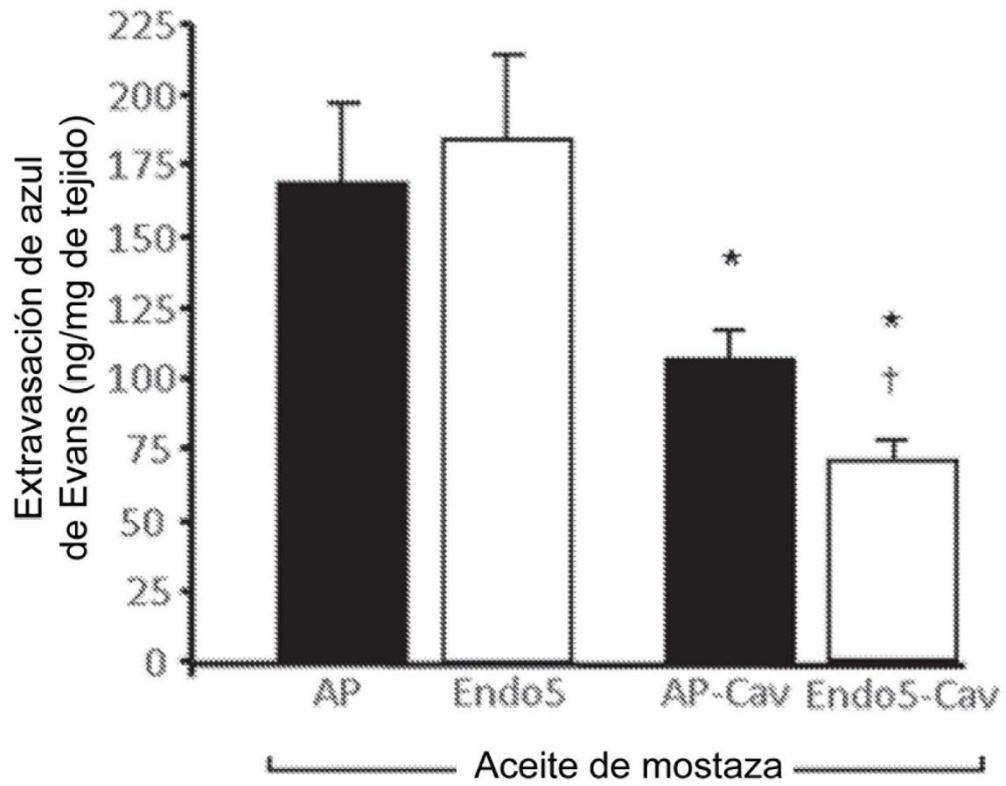


FIG. 3B

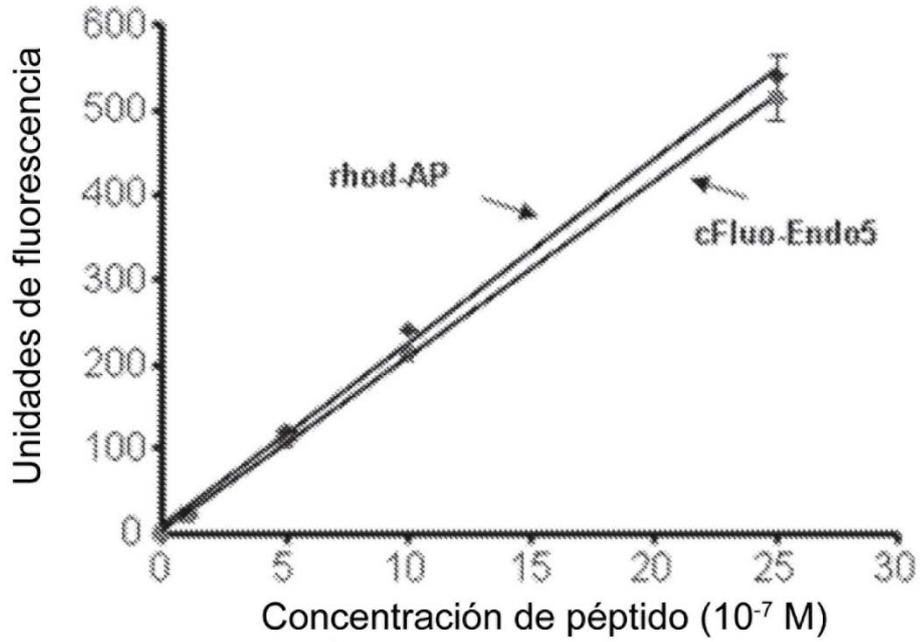


FIG. 4A

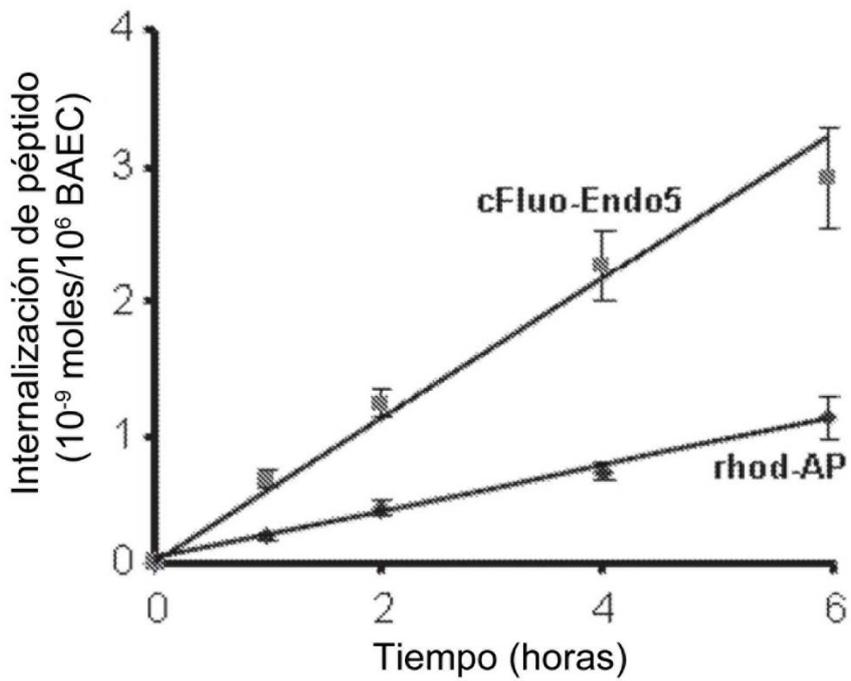


FIG. 4B

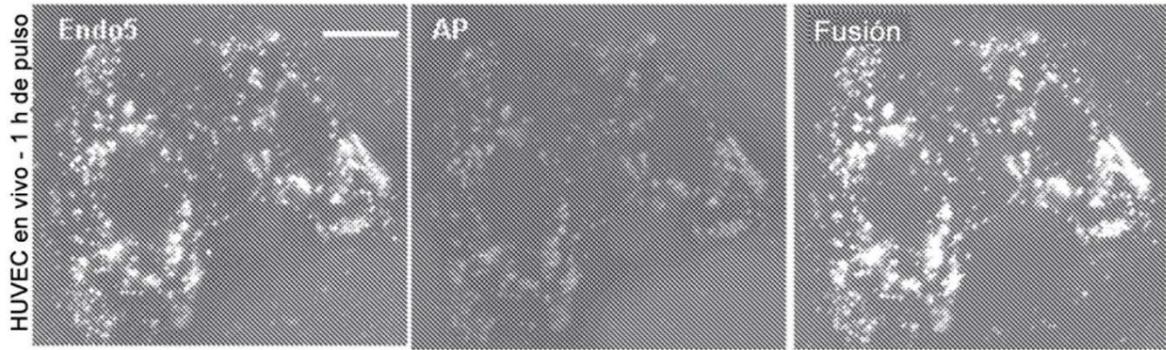


FIG. 5A

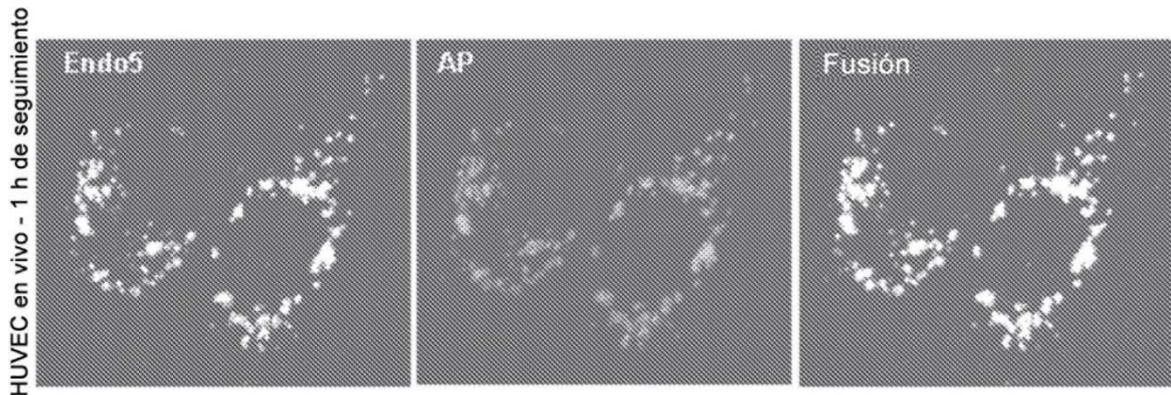


FIG. 5B

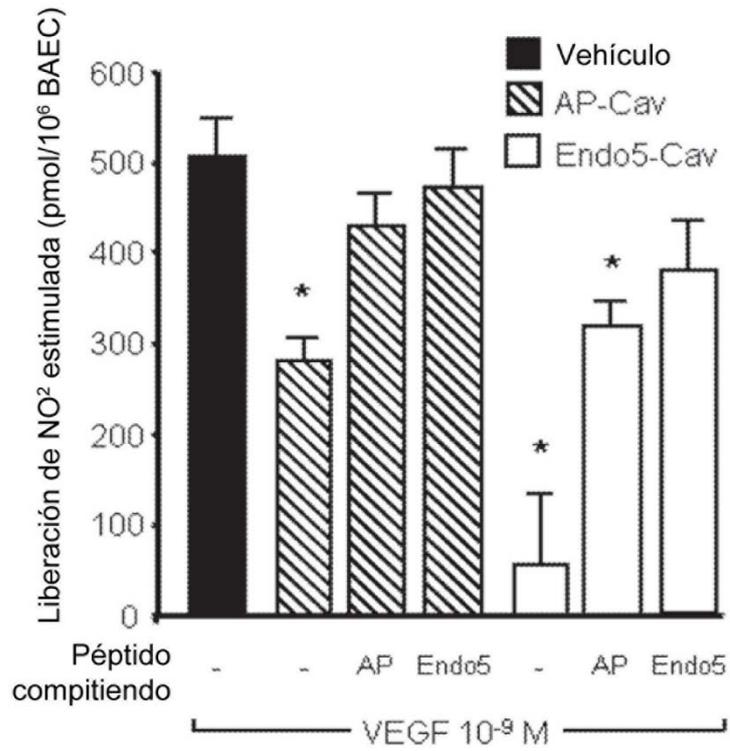


FIG. 5C

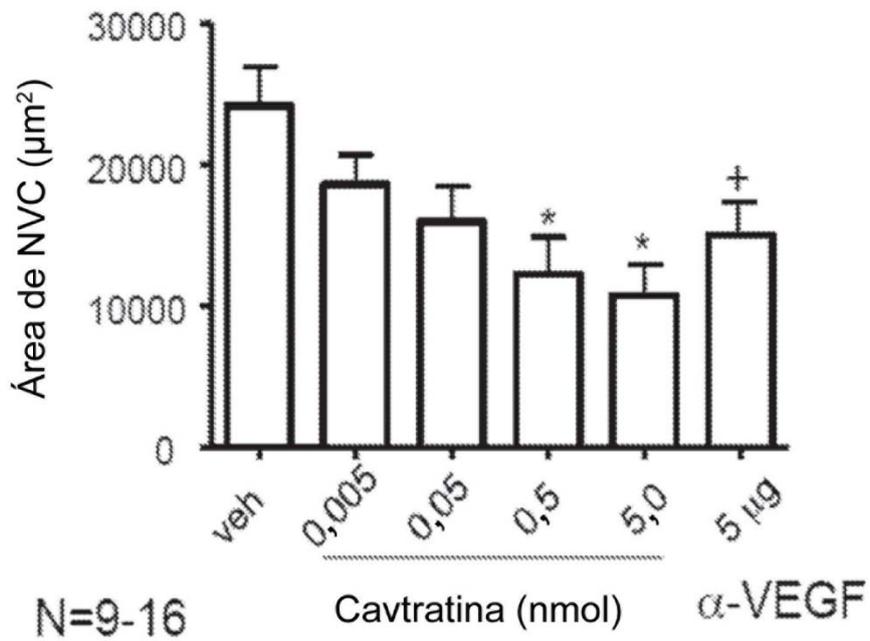


FIG. 6