

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 919**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/KR2013/008445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14046481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13839102 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2899199**

54 Título: **Péptido de penetración celular, conjugado que comprende el mismo y composición que comprende el conjugado**

30 Prioridad:

19.09.2012 KR 20120104144
28.09.2012 KR 20120109216
18.02.2013 KR 20130017046
18.02.2013 KR 20130017169

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2020

73 Titular/es:

GEMVAX & KAEL CO., LTD. (50.0%)
58, Techno 11-ro, Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR y
KIM, SANG JAE (50.0%)

72 Inventor/es:

KIM, SANG JAE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 743 919 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

Péptido de penetración celular, conjugado que comprende el mismo y composición que comprende el conjugado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos de penetración celular derivados de la enzima telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), a conjugados de los péptidos de penetración celular, a principios activos y a composiciones que comprenden el conjugado.

Antecedentes

10 Aunque las sustancias de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, proteínas, nanopartículas, etc., tienen grandes potenciales como sustancias terapéuticas a nivel molecular, sus usos son limitados debido a la incompetencia para penetrar en los tejidos y la membrana celular. El desarrollo de un sistema para suministrar tales sustancias a la célula ha sido el área activa de investigación en las últimas dos décadas. El transporte de las sustancias dentro de la célula ha sido un tema de conversación en un tratamiento de procedimiento molecular. Las sustancias de bajo peso molecular, los ácidos nucleicos o las nanopartículas se transportaron dentro de la célula por varios reactivos, electroporación o choque térmico. Sin embargo, fue difícil encontrar un procedimiento adecuado de suministro de proteínas dentro de la célula sin interrumpir la actividad y la integridad de las proteínas. En la década de 1980, en la investigación realizada sobre el estudio de la capacidad de penetración celular del VIH, se descubrió que la proteína VIH-TAT que consiste en 11 aminoácidos específicos juega un papel importante en un proceso de transporte dentro de la célula. Por lo tanto, en la década de 1990, los estudios sobre cómo encontrar el procedimiento correcto para transportar proteínas dentro de la célula han sido el área intensa de investigación.

20 Mitu y col. (Bioconjugate Chemistry 2009;20(10):1860-1868) y Brugnano y col. (Biomolecular Concepts 2010; 1 (2)) describen péptidos de penetración celular y, en el caso de Mitu y col., también péptidos de penetración celular enlazados a agentes de contraste.

25 Se sabe que un telómero es una secuencia repetitiva de material genético encontrado en los extremos de cromosomas que evita que los cromosomas se dañen o se unan a otros cromosomas. La longitud del telómero se acorta en cada división celular y, después de un determinado número de divisiones celulares, la longitud del telómero se acorta extremadamente en la medida que la célula deja de dividirse y muere. Por otro lado, se sabe que el alargamiento de los telómeros amplía el lapso de vida de una célula. Por ejemplo, las células cancerosas excretan una enzima denominada telomerasa, que evita el acortamiento de los telómeros, dando como resultado de esta manera la proliferación de células cancerosas.

30 Un objeto de la presente invención es proporcionar un novedoso péptido vehículo de penetración celular.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el polinucleótido que codifica el péptido novedoso.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un conjugado de un principio activo y un péptido de penetración celular.

35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende un conjugado de un principio activo y un péptido de penetración celular.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un principio activo y un péptido de penetración celular.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición cosmética funcional que comprende un conjugado de un principio activo y un péptido de penetración celular.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición de alimentación saludable que comprende un conjugado de un principio activo y un péptido de penetración celular.

Sumario de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

45 En un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado de un péptido vehículo de penetración celular y un principio activo, en el que el péptido vehículo es un péptido que consiste en al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6 o un péptido que tiene al menos un 80 % de homología con al menos una de SEQ ID NO: 1-6, en el que el péptido que tiene al menos un 80 % de homología retiene la capacidad de penetración celular de cualquier secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6 y en el que dicho conjugado es capaz de administrar el principio activo en una célula.

50 En una realización, el péptido vehículo consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera de SEQ ID NO: 1-6.

En una realización, el principio activo es

- 5 a) al menos uno seleccionado de una proteína, un ácido nucleico, un péptido, un lípido, un lípido de glicol, un mineral, un azúcar, una nanopartícula, un producto biológico, un agente de contraste, un fármaco y un compuesto químico; o
b) una proteína o un péptido, opcionalmente una citocina, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una enzima terapéutica, un receptor soluble o un ligando.

En una realización, el péptido vehículo y el principio activo están

- a) conjugados a través de un enlace covalente, opcionalmente mediado por un enlazador; o
b) conjugados a través de un enlace no covalente.

- 10 En una realización, el péptido vehículo se combina con isotiocianato de fluoresceína o Proteína Fluorescente Verde (GFP).

En una realización, el principio activo es un agente de contraste.

- 15 En una realización, el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste en un agente de contraste radioopaco, un agente de contraste paramagnético, un agente de contraste superparamagnético y un agente de contraste CT.

En una realización, el agente de contraste se basa en hierro, opcionalmente un carboxilato de ferroceno.

En una realización en la que el principio activo es un agente de contraste, el conjugado es para su uso en contrastar una célula, opcionalmente una célula madre.

- 20 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende el conjugado de acuerdo con el primer aspecto, que es una composición farmacéutica, una composición cosmética o una composición de alimentos saludables.

En una realización, la composición farmacéutica es para el tratamiento o la prevención de una enfermedad.

En una realización, la composición farmacéutica para dicho uso es para el tratamiento o la prevención de un cáncer, un trastorno inmunitario o una enfermedad asociada a un mal funcionamiento de los fibroblastos.

- 25 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para administrar un principio activo en una célula, opcionalmente en mitocondrias, que comprende administrar el conjugado del primer aspecto o la composición del segundo aspecto a una célula *in vitro*, en el que el péptido vehículo es un péptido de penetración celular que logra la administración del principio activo en la célula.

- 30 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un péptido vehículo que penetra en las células, en el que el péptido vehículo es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 y 6 o un péptido que tiene al menos un 80 % de homología con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 y 6.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con el cuarto aspecto.

- 35 En un sexto aspecto, la invención se refiere a una célula transformada que comprende un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con el quinto aspecto.

Aplicabilidad industrial

- Los principios activos que son difíciles de transportar dentro de una célula pueden transportarse fácilmente dentro de una célula usando el péptido o el conjugado del péptido y los principios activos, desvelados en la presente invención. Esto significa que la efectividad de los principios activos puede aumentarse y por lo tanto la dosificación puede reducirse. Como resultado, los efectos secundarios debidos a la administración de fármacos pueden minimizarse y puede aumentarse la eficacia del tratamiento. Especialmente, como se administran los fármacos localmente en las mitocondrias, pueden mejorarse las enfermedades o los trastornos relacionados con las mitocondrias y puede aumentarse la eficacia de la profilaxis y el tratamiento de enfermedades. En un caso de cosméticos, con una pequeña cantidad de principios activos, puede crear un efecto excepcional. Al conjugar un péptido con una sustancia de contraste, puede usarse como sustancia de contraste para monitorizar un procedimiento de trasplante celular o células trasplantadas en un tratamiento celular. Especialmente, puede usarse eficazmente como sustancia de contraste para las células madre inyectadas dentro de un cuerpo.

Breve descripción de los dibujos

- 50 La Figura 1 representa la esquematización del gen indicador de la SEQ: 1 a la SEQ: 6 son construcciones de fusión de proteína fluorescente verde mejorada (proteína fluorescente verde mejorada, EGFP) producidas por el

procedimiento de clones de ADN recombinante (clon). La Figura 2 a la Figura 7 representan e ilustran que la captación celular de los números de células de una célula HeLa tratada después de que FITC se fusionó con el péptido de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 y se analizó por citometría de flujo (Citometría de flujo). Las células de control se trataron solo con FITC.

La Figura 8 a la Figura 11 representan e ilustran que la captación celular de los números de células de una línea celular Huh7 tratada después de que FITC se fusionó con el péptido de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6 y se analizó por citometría de flujo (Citometría de flujo). Las células de control se trataron solo con FITC.

La Figura 12 a la Figura 15 representan e ilustran que la captación celular de los números de células de una línea celular humana de linfocitos T tratada después de que FITC se fusionó con el péptido de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6 y se analizó por citometría de flujo (Citometría de flujo). Las células de control se trataron solo con FITC.

La Figura 16 a la Figura 21 representan e ilustran que el resultado de la toxicidad y la viabilidad celular de una célula HeLa tratada después de que FITC se fusionó con el péptido de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 y se analizó por citometría de flujo (Citometría de flujo). Las células de control se trataron solo con FITC.

La Figura 22 a la Figura 27 representan e ilustran que la penetración celular de la proteína de fusión pep(CPP)-EGFP se analizó por citometría de flujo y microscopía confocal.

Descripción detallada de la invención

Las proteínas, los ácidos nucleicos, los péptidos o los virus, etc. tienen un gran potencial para usarse como sustancias terapéuticas. Sin embargo, sus usos son limitados porque no pueden penetrar en los tejidos y la membrana celular debido a los tamaños del nivel molecular. Aunque, el tamaño de las moléculas es pequeño, no pueden penetrar la bicapa lipídica debido a la estructura o características de las moléculas. Por lo tanto, mediante el uso de electroporación, choque térmico, etc., hubo intentos de transportar proteínas, ácidos nucleicos, péptidos o virus dentro de la célula; fue difícil transferirlos sin dañar la membrana celular ni mantener los estados activos de las moléculas anteriores. Se han realizado muchos estudios ya que la proteína TAT (el activador Trans-Activador de la Transcripción) derivada del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) ha demostrado funcionar como péptido penetrador celular que puede transportar enormes sustancias activas dentro de la célula. Específicamente, se han realizado estudios sobre sustancias que pueden transportar moléculas enormes tales como proteínas, ácidos nucleicos, péptidos o virus dentro de la célula sin provocar ninguna toxicidad, a diferencia de la proteína TAT que provoca toxicidad dentro de la célula. Por lo tanto, la presente invención se completó ya que los presentes inventores han descubierto que los péptidos derivados de la telomerasa tienen una efectividad sobresaliente como péptido de penetración celular sin una toxicidad notable.

Los péptidos se desvelan en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 mostrados en la Tabla 1 a continuación. La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de longitud completa de la proteína de la telomerasa humana. El "nombre" en la Tabla 1 a continuación se usó para la distinción de los péptidos. En una realización específica diferente de la presente invención, más de un péptido de los péptidos mencionados en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 puede comprender un "péptido sintético", un péptido sintetizado de áreas seleccionadas de la telomerasa. En la presente memoria descriptiva, el término "pep" en el presente documento se refiere a un péptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos entre la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 6 o, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos por encima del 80 % de homología con las secuencias anteriormente mencionadas o un fragmento peptídico de los péptidos anteriormente mencionados.

[TABLA 1]

SEQ ID NO.	Nombre	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
1	pep73	[461-480]	VYGFVRACLRRLVPPGLWGS	20 aa
2	pep84	[681-700]	LGLDDIHRWRTFVLRVRAQ	20 aa
3	pep98	[961-980]	NRGFKAGRNMRRKLFGLVRL	20 aa
4	pep144	[731-750]	SIIKPQNTYCVRRYAVVQKA	20 aa
5	pep155	[951-970]	RTSIRASLTFNRGFKAGRNM	20 aa
6	pep-RIA-148	[616-623]	LLTSRLRF	8 aa
7	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
8	Telomerasa	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRR LGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWD ARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGA KNVLAFGFALLDGARGGPPPEAFTTSVRSYLPN TVTDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARCA LFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPH ASGPRRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPG ARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPV GQGSWAHPGRTRGSPDRGFCVVSPARPAAEEA TSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSRPP RPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFL LSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRL PRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKT HCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEEEDT DPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVP PGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQ ELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLR EEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQK NRLLFFYRKSVWSKLSIGIRQHLKRVQLRELSE AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVSNYE RARRPGLLGASVLGLDDIHRWRVFLRVRAQ DPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKP QNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLT DLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLN EASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLL RLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCV VNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFP WCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNR GFKAGRNMRRKLFVLRKCHSLFLDLQVNSL QTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWVW NPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKG AAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTVVPL LGSRLTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPS DFKTILD	1132 aa

5 En una realización de la presente invención el polinucleótido codifica un péptido vehículo de penetración celular que consiste en una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 o un péptido que tiene más del 80 % de homología con las secuencias anteriormente mencionadas. El polinucleótido anteriormente mencionado permite la producción de los péptidos en grandes cantidades. Por ejemplo, el cultivo de vectores que incluyen péptidos polinucleótidos permite la producción de péptidos en grandes cantidades.

10 Los péptidos desvelados en el presente documento pueden incluir un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos por encima del 80 %, por encima del 85 %, por encima del 90 %, por encima del 95 %, por encima del 96 %, por encima del 97 %, por encima del 98 % o por encima del 99 % de homología. Además, los péptidos desvelados pueden incluir un péptido que comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos entre la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 6 o sus fragmentos y un péptido con más de 1 aminoácido transformado, más de 2 aminoácidos transformados, más de 3 aminoácidos transformados, más de 4 aminoácidos transformados, más de 5 aminoácidos transformados, más de 6 aminoácidos transformados o más de 7 aminoácidos transformados.

15 En una realización de la presente divulgación, los cambios en la secuencia de aminoácidos pertenecen a la modificación de las características físicas y químicas del péptido. Por ejemplo, la transformación de aminoácidos puede realizarse mejorando la estabilidad térmica del péptido, alterando la especificidad del sustrato y cambiando el pH óptimo.

El término "aminoácido" en el presente documento incluye no solamente los 22 aminoácidos convencionales que se integran de forma natural en el péptido sino también los isómeros D y los aminoácidos transformados. Por lo tanto,

5 en una realización específica de la presente invención, un péptido en el presente documento incluye un péptido que tiene D-aminoácidos. Por otro lado, un péptido puede incluir aminoácidos no convencionales tales como los que se han modificado post-traduccionalmente. Los ejemplos de modificación post-traducciona

10 Un péptido desvelado en el presente documento puede ser un péptido de tipo silvestre que se ha identificado y aislado de fuentes naturales. Por otro lado, cuando se compara con los fragmentos peptídicos de una cualquiera de entre la secuencia amino SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 6, los péptidos desvelados en el presente documento pueden ser mutantes artificiales que comprenden uno o más aminoácidos sustituidos, eliminados y/o insertados. La alteración de aminoácidos en el polipéptido de tipo silvestre - no solo en mutantes artificiales - comprende la sustitución conservativa de aminoácidos que no influyen en el plegamiento y o la activación de proteínas. Los

15 ejemplos de sustitución conservativa pertenecen al grupo que consiste en aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparaginas), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica de la presente invención. Las alteraciones más comunes producidas son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly y las alteraciones opuestas. Otro ejemplo de sustituciones conservativas se muestra en la siguiente Tabla 2.

20

[TABLA 2]

Aminoácido original	Ejemplos de sustitución de restos	Sustitución de restos preferible
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

25 La transformación sustancial de las propiedades biológicas de los péptidos se realiza seleccionando una sustitución significativamente diferente en las siguientes efectividades: (a) la efectividad en el mantenimiento de la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de sustitución, tales como láminas o estructuras helicoidales tridimensionales, (b) la efectividad en el mantenimiento de la carga eléctrica o la hidrofobicidad de la molécula en el área diana o (c) la

efectividad en el mantenimiento de la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos por las propiedades generales de la cadena lateral como las siguientes:

- (1) hidrofobicidad: Norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofiliidad neutra: cys, ser, thr;
- 5 (3) acidez: asp, glu;
- (4) basicidad: asn, gln, his, lys arg;
- (5) resto que afecta la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromaticidad: trp, tyr, phe.

10 Las sustituciones no conservativas pueden realizarse intercambiando un miembro de las clases anteriores por diferentes clases. Cualquier resto de cisteína que no esté relacionado con el mantenimiento de la estructura tridimensional adecuada del péptido puede sustituirse típicamente por serina, aumentando de esta manera la estabilidad oxidativa de la molécula y evitando la reticulación inapropiada. Por el contrario, puede lograrse una mejora de la estabilidad añadiendo enlace o enlaces cisteína al péptido.

15 Los tipos alterados de variantes de aminoácidos de los péptidos son aquellos que cambiaron el patrón de glucosilación de anticuerpos. El término "cambio" en el presente documento se refiere a la eliminación de al menos un resto de carbohidrato que se encuentra en un péptido y/o la adición de al menos un resto glucosilado que no existe dentro de un péptido.

20 La glucosilación en péptidos está típicamente conectada a N o conectada a O. La expresión "conectado a N" en el presente documento se refiere a que los restos de carbohidratos están unidos a la cadena lateral de los restos de asparagina. Como secuencias de tripéptidos, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina (en las que la X es cualquier aminoácido excepto prolina) son la secuencia de reconocimiento para unir enzimáticamente el resto de carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, con la presencia de una de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido, se crean los posibles sitios de glucosilación. "Glucosilación conectada a O" significa unir uno de azúcar N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a aminoácidos de hidroxilo. Los aminoácidos de hidroxilo son más típicamente serina o treonina, pero pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

25 La adición del sitio de glucosilación a un péptido se realiza convenientemente cambiando la secuencia de aminoácidos para que contenga la secuencia de tripéptidos mencionada anteriormente (para sitios de glucosilación enlazada a N). Estos cambios pueden realizarse mediante la adición de al menos un resto de serina o treonina a la primera secuencia de anticuerpos o mediante sustitución con esos restos (para sitios de glucosilación enlazados a O).

30 En una realización de la presente invención, se proporciona un péptido de penetración celular que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 o un péptido que tiene una homología superior al 80 % de la secuencia de aminoácidos con las secuencias mencionadas anteriormente.

35 La divulgación también permite que se proporcione una composición farmacéutica que comprende el péptido como un sistema de administración de fármacos para transportar más de un principio activo, en la que el péptido comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, el péptido tiene una homología superior al 80 % con la secuencia mencionada anteriormente o el péptido es un fragmento del péptido mencionado anteriormente.

40 Un péptido que comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, un fragmento del péptido mencionado anteriormente, o un péptido que tiene una homología superior al 80 % con la secuencia mencionada anteriormente, es seguro y tiene una efectividad sobresaliente como péptido de penetración celular. Por lo tanto, el péptido puede conjugarse con un fármaco para transportar el fármaco dentro de la célula.

45 En una realización de la presente invención, se proporciona un conjugado de un péptido y un principio activo para transportarse, en el que el péptido consiste en al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, en la que el péptido que tiene al menos un 80 % de homología retiene la capacidad de penetración celular de una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1-6 y en la que dicho conjugado es capaz de administrar el principio activo en una célula o el péptido tiene una homología superior al 80 % con el péptido mencionado anteriormente. En una realización de la presente invención, un principio activo puede ser al menos uno seleccionado de proteínas, ácidos nucleicos, péptidos, lípidos, glucolípidos, minerales, azúcares, sustancias de contraste, fármacos y compuestos químicos. En una realización de la presente invención, los principios activos pueden ser péptidos. En una realización de la presente invención, los principios activos pueden ser citocinas, un anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, enzimas terapéuticas, receptores solubles o ligandos.

55 Un péptido de penetración celular desvelado en el presente documento significa un péptido que puede transportar carga desde *in vitro* y/o *in vivo* hacia el interior de la célula. Una "carga" desvelada en el presente documento comprende todas las sustancias que pueden transportarse dentro de la célula a través de conjugación con un péptido de penetración celular, por ejemplo, todas las sustancias que desean aumentar la efectividad de penetración celular, específicamente fármacos, cosméticos o principios activos de alimentos saludables, más específicamente sustancias que no pueden transportarse dentro de la célula por la vía general, más específicamente, azúcares,

nanopartículas, formulación biológica, virus, sustancias de contraste u otros compuestos químicos que pueden tener proteínas, ácidos nucleicos, un péptido, minerales, glucosa como un ejemplo, pero no limitado a esos. Un "fármaco" desvelado en el presente documento es un concepto amplio que incluye una sustancia que se transportará para el alivio, la profilaxis, el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades, heridas o un síntoma específico.

- 5 Un "péptido vehículo" desvelado en el presente documento es un péptido que puede transportar principios activos a un sitio diana a través de la conjugación con principios activos.

En una realización de la presente invención, la proteína o el péptido como carga comprenden uno o más de hormonas, análogo hormonal, enzima, inhibidores enzimáticos, proteínas (o péptidos) de transferencia de señal, anticuerpo y vacuna, pero no limitado a esos. En una realización de la presente invención, un ácido nucleico es una molécula que pueden ser moléculas de ADN o de ARN espontáneas o artificiales, ya sean monocatenarias o bicatenarias. La molécula de ácido nucleico puede ser una o más ácidos nucleicos del mismo tipo (por ejemplo, que tienen una misma secuencia de nucleótidos) o ácidos nucleicos de diferentes tipos. Las moléculas de ácido nucleico comprenden uno o más ADN, ADNc, ADN señuelo, ARN, ARNip, miARN, ARNhp, ARNtp, ARNnop, ARNnp, PNA, oligómero antisentido, plásmidos y otros ácidos nucleicos modificados, pero no limitado a esos. En una realización de la presente invención, el virus comprende el virus entero o el núcleo del virus que incluye los ácidos nucleicos del virus. En una realización de la presente invención, una sustancia química es una indicación amplia que comprende una sustancia natural o sintética que puede actuar como un fármaco.

Un fenómeno en el que la expresión de ADN específica está controlada por ARN bicatenario (ARNbc) en un procedimiento de expresión de ADN se denomina interferencia de ARN; iARN. Desde que el fenómeno se descubrió por primera vez en *C. elegans* en 1998, se descubrió que el fenómeno es común en las plantas, moscas de la fruta y mamíferos (Fire y col., *Nature*, 391:806-811, 1998; Novina y Sharp, *Nature*, 430:161-164, 2004).

La interferencia de ARN está mediada por ARNbc que tiene 19-25 pb que entra en las células, tras lo que se combina con RISC (complejo silenciador inducido por ARN). La unión de la cadena antisentido de ARNbc a la secuencia complementaria de ARNm desencadena la degradación del ARNm diana por la enzima endonucleasa encontrada en el complejo RISC (Rana, T. M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:23-36, 2007; Tomari, Y. y Zamore, P. D., *Genes Dev.*, 19: 517-529, 2005). En otras palabras, el ARNip está implicado en la interferencia de ARN al suprimir la producción de proteínas específicas y por lo tanto al interferir con la expresión de ADN. El ARNip que consiste en 19-23 nucleótidos, forma un par de bases de acuerdo con el orden complementario de ARNm para el ARN mensajero específico (ARNm) para formar ARN bicatenario. Después de eso, el ARN bicatenario se desintegra especialmente al mismo tiempo que se retira el ARN mensajero de las células. El ARNip se ha destacado como una sustancia para la terapia génica porque mostró un efecto sobresaliente en la supresión de la expresión de ADN específico en estudios recientes en animales. El ARNip con activación más alta y selección precisa de ADN, se ha estudiado durante los últimos 20 años y se espera que reemplace los oligonucleótidos antisentido que actualmente se usan como remedio. Por lo tanto, muchas compañías farmacéuticas están desarrollando un remedio basado en ARNip. En comparación con los oligonucleótidos antisentido existentes, se sabe que el ARNip inhibe la expresión génica con una cantidad 10 veces menor e inhibe solamente genes diana con una selectividad sobresaliente de genes. La técnica de ARNip, especialmente para el fin del tratamiento, tiene una gran ventaja ya que puede diseñarse fácilmente en comparación con otros fármacos y tiene características tales como alta selectividad diana e inhibición de la expresión génica específica. Además, dado que la supresión de la expresión génica por interferencia de ARN utiliza el mecanismo presente de forma natural *in vivo*, la toxicidad es baja. Sin embargo, el ARNip tiene la desventaja de que no puede transportarse fácilmente a una célula ya que no puede penetrar en la membrana celular ya que es aniónico y se descompone fácilmente en un corto periodo de tiempo debido a la baja estabilidad *in vivo*. Esta desventaja del ARNip puede resolverse conjugando con un péptido vehículo descrito en el presente documento.

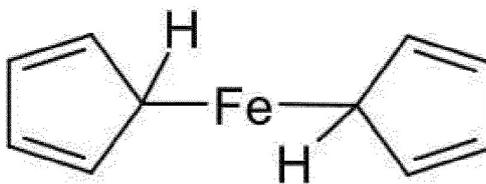
- 45 En una realización de la presente invención, los fármacos transportados dentro de la célula por el péptido de penetración celular pueden comprender uno o más transportadores de fármacos como liposoma, micelas, nanopartículas, partículas magnéticas o puntos cuánticos.

La expresión "sustancia de contraste" desvelada en el presente documento es una indicación amplia que comprende todas las sustancias usadas para contrastar estructuras o fluidos dentro del cuerpo en formaciones de imágenes médicas. Una sustancia de contraste apropiada comprende agente de contraste radioopaco, un agente de contraste paramagnético, un agente de contraste superparamagnético, CT (tomografía computarizada) y otras sustancias de contraste, pero no limitado a esos. Por ejemplo, un agente de contraste radioopaco (para formación de imágenes de rayos X) comprenderá un compuesto de yodo inorgánico y un compuesto de yodo orgánico (por ejemplo, diatrizoato), metales radiopacos y sus sales (por ejemplo, plata, oro, platino, etc.) y otros compuestos radioopacos (por ejemplo, sales de calcio, sales de bario tales como sulfato de bario, tántalo y tántalo oxidado). Una sustancia de contraste paramagnético apropiada (para formación de imágenes de RM) comprende ácido gadolinio dietil triaminopentaacético (Gd-DTPA) y sus derivados, otro gadolinio, manganeso, hierro, disprosio, cobre, europio, erbio, cromo, complejo de níquel y cobalto, por ejemplo, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,-N',N''-triacético (DO3A), ÁCIDO 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-TRIACÉTICO (NOTA), ácido 1,4,8,10-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), ácido hidroxibencilendiamina diacético (HBED). Una sustancia de contraste

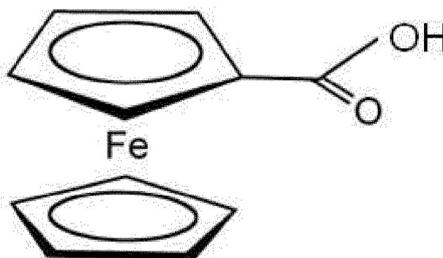
superparamagnética apropiada (para formación de imágenes de RM) comprende magnetita, óxido de hierro súper paramagnético (SPIO), óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) y óxido de hierro monocristalino. Otras sustancias de contraste apropiadas son agentes de contraste CT yodados, no yodados, iónicos y no iónicos, una sustancia de contraste como etiqueta rotativa o agente eficaz para el diagnóstico.

- 5 Otros ejemplos de sustancias de contraste comprenden β -galactosidasa, Proteína Verde Fluorescente, Proteína Cian Fluorescente, luciferasa, pero no limitado a esos, y un gen marcador que codifica proteínas que pueden detectarse fácilmente cuando se expresan dentro de las células. Pueden usarse varios marcadores tales como radionúclidos, harina, enzima, enzima-sustrato, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos (especialmente hapteno).
- 10 En un ejemplo de la presente invención, una sustancia de contraste es el ácido ferrocenocarboxílico de la fórmula química 2 a continuación. La estructura del ferroceno se muestra en la fórmula química 1.

[Fórmula química 1]

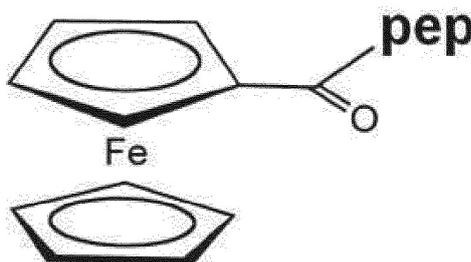


[Fórmula química 2]



- 15 En un ejemplo de la presente invención, un conjugado de péptido de penetración celular y una sustancia de contraste es Ferrocenocarboxílico-pep (Ferrocenocarboxílico-pep) que se muestra en la fórmula química 3 a continuación.

[Fórmula química 3]



- 20 En una realización de la presente invención, un péptido o composición puede fusionarse con uno o más marcadores detectables. Los marcadores pueden ser compuestos que pueden detectarse en respuestas químicas, físicas o enzimáticas, o compuestos que generan señales directa o indirectamente en las respuestas. El marcaje y la detección después de eso pueden realizarse de acuerdo con el procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, Sambrook, J. y Russel, D.W.(2001); y Lottspeich, F. y Zorbas H. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlín, Alemania). Los marcadores comprenden marcador fluorescente, marcador enzimático, marcador cromogénico, marcador luminiscente, marcador de radiación, hapteno, biotina, complejo de metal, oro metal y coloidal, pero no limitado a esos. Todas las formas de estos marcadores son bien conocidas en este campo de trabajo, pueden obtenerse comercialmente de diversos proveedores.

- 25 En una realización de la presente divulgación, una carga puede combinarse directamente con el péptido. En otra realización de la presente divulgación, una carga puede combinarse con el péptido a través de diversos tipos de enlaces tales como enlaces covalentes o no covalentes. Una carga, por ejemplo, puede combinarse con el N-

terminal o C-terminal del péptido en una realización de la presente invención. Por ejemplo, una carga puede estar unida al péptido mediante enlaces disulfuro o enlaces covalentes. Los enlaces covalentes son los enlaces que una carga puede unirse a la α -amina del glutamato N-terminal, o la amina de los restos de lisina C-terminales. Además, un péptido y una carga pueden combinarse mediante un enlace no covalente, que puede tener un péptido o una carga puede encapsular al otro en forma de cápsula.

En otra realización de la presente divulgación, un péptido puede combinarse con una carga a través de un enlazador. Por ejemplo, un péptido puede combinarse con una carga uniendo una carga a un conector después de introducir un conector tales como el conector Hynic (ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico), a la α -amina del glutamato N-terminal, o la amina de los restos de lisina C-terminales.

En otra realización de la presente divulgación, cuando una carga es ADN o ARN, el grupo SH (grupo tiol) se introduce en el péptido y el grupo maleimida se introduce en el ADN o ARN, después, el grupo SH del péptido y el grupo maleimida de ADN o ARN se combinan, creando así un enlace entre la carga y el péptido.

En otra realización de la presente divulgación, cuando una carga es un péptido o proteína, el ADN que expresa una carga se combina con el ADN que expresa un péptido vehículo, y al expresar esto, una carga y un péptido pueden combinarse como una forma de proteína de fusión. Los ejemplos específicos de combinación por una proteína de fusión son los siguientes: cuando se fabrica el cebador para la producción de proteína de fusión, un nucleótido que codifica un péptido vehículo se une en frente de un nucleótido que expresa una carga y el nucleótido obtenido se inserta en un vector tales como el vector pET usando una enzima de restricción y el nucleótido se expresa mediante transformación en una célula tales como BL-21 (DE3). En este momento, una proteína de fusión debe expresarse eficazmente al tratarla con un agente inductor de la expresión como IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido). Después, la proteína de fusión expresada se purifica mediante purificación con etiqueta His y se dializa con PBS y se añade a un kit para concentrarla mediante centrifugación en tal condición durante 5 a 20 minutos a 2.000 a 4.000 rpm.

En una realización de la presente invención, un péptido vehículo se combina con sustancias de tinción, sustancias fluorescentes, específicamente FITC (isotiocianato de fluoresceína) o GFP (proteína fluorescente verde). En una realización de la presente invención, FITC se combina con el grupo amino (NH_3^+) de lisina en el N-terminal o C-terminal de un péptido vehículo. En el caso de un péptido, en el que la lisina no existe en su extremo, el péptido puede combinarse con FITC a través de un conector que incluye lisina.

El péptido vehículo desvelado en el presente documento que es el péptido que comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 o el péptido que tiene más del 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con los péptidos mencionados anteriormente o un fragmento del péptido mencionado anteriormente, puede combinarse con una carga en una fracción molar de 1:1, pero puede combinarse en una fracción molar distinta de 1:1. Por ejemplo, una fracción molar de CPP y una carga puede ser más de 2:1, específicamente, más de 2:1, más de 3:1, más de 4:1, más de 5:1, más de 6:1, más de 7:1, más de 8:1, más de 9:1 o más de 10:1. Esto significa que numerosas moléculas de péptidos vehículo pueden combinarse con una molécula de carga. Las numerosas moléculas de péptidos vehículo pueden combinarse en serie o en paralelo. "Combinado en serie" significa que un péptido vehículo y una molécula de carga han de combinarse en los aminoácidos terminales. "Combinado en paralelo" significa que han de combinarse en un sitio distinto de los aminoácidos terminales. Por otro lado, la fracción molar de un péptido vehículo y una carga puede ser más de 1:2. Esto significa que una molécula de péptido vehículo puede combinarse con numerosos números de una molécula de carga. Por ejemplo, una fracción molar de un péptido vehículo y una carga puede ser 1:2, específicamente, más de 1:2, más de 1:3, más de 1:4, más de 1:5, más de 1:6, más de 1:7, más de 1:8, más de 1:9 o más de 1:10.

Puede encontrar fácilmente una vía de movimiento del péptido combinado con isotiocianato de fluoresceína. Por lo tanto, un péptido vehículo en una realización de la presente divulgación se usará para obtener imágenes celulares o detectar una ruta de suministro de fármacos dentro de una célula.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un uso del péptido como un vehículo de administración de fármacos para transportar más de un principio activo, en el que el péptido comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 o el péptido es un fragmento del péptido mencionado anteriormente, o el péptido tiene más del 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el péptido mencionado anteriormente. El uso puede indicar un uso terapéutico o no terapéutico.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para administrar fármacos dentro de una célula de un sujeto que comprende una etapa de administrar una composición que comprende un fármaco; y el péptido; en el que el péptido comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 o el péptido es un fragmento del péptido mencionado anteriormente, o el péptido tiene más del 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el péptido mencionado anteriormente.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar la ruta de administración del fármaco que comprende una etapa de aplicar el péptido y una sustancia de contraste a un sujeto; en el que el péptido comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 o

el péptido es un fragmento del péptido mencionado anteriormente, o el péptido tiene más del 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el péptido mencionado anteriormente.

5 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar la ruta de administración del fármaco que comprende una etapa de aplicación del conjugado del péptido y una sustancia de contraste a un sujeto; en el que el péptido comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 o el péptido es un fragmento del péptido mencionado anteriormente, o el péptido tiene más del 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el péptido mencionado anteriormente.

10 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un kit para la administración de fármacos a una célula de un sujeto que contiene la composición e instrucciones, en el que la composición comprende un conjugado de un péptido de la divulgación y un fármaco para administración, en el que el péptido comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 o el péptido es un fragmento del péptido mencionado anteriormente, o el péptido tiene más del 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el péptido mencionado anteriormente, en el que las instrucciones incluyen al menos una dosis de administración, la ruta de administración, la frecuencia de administración y la indicación de la composición.

15 En una realización de la presente divulgación, se proporciona la composición cosmética o alimenticia que comprende un principio activo; y el péptido; en la que el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, el péptido tiene una homología superior al 80 % de la secuencia de aminoácidos con la secuencia mencionada anteriormente, el péptido es un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente. En una realización de la presente invención, se proporciona una composición cosmética o alimenticia que comprende un conjugado del primer aspecto de la invención.

20 En una realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, cosmética o alimentaria con una capacidad sobresaliente para transportar principios activos dentro de una célula, que comprende un conjugado del primer aspecto de la invención.

25 La mitocondria, como un orgánulo central en el metabolismo energético de una célula eucariota, es un primer orgánulo intracelular que se sabe que está relacionado con enfermedades humanas (Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of non thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study, J Clin Invest 41: 1776-804, 1962).

30 Dado que las mitocondrias juegan un papel importante en el control del metabolismo energético de las células y la apoptosis, actúan como una diana principal para diversos fármacos terapéuticos. Además, este orgánulo está implicado en el control de la concentración de calcio dentro de la célula, la cadena respiratoria mitocondrial actúa como un sistema de transporte de electrones que es importante en la producción de energía y provoca la producción de especies reactivas de oxígeno. Como resultado, la función mitocondrial anormal tiene una estrecha relación con enfermedades de adultos tales como la diabetes, cardiomiopatía, infertilidad, ceguera, enfermedades renales/hepáticas y accidente cerebrovascular (Modica-Napolitano KS, Singh KK: April mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. Expert Rev Mol Med 11:1-19, 2002). Además, se está sugiriendo que las mutaciones genéticas mitocondriales estén implicadas en el estallido del envejecimiento, enfermedad neuronal degenerativa y cáncer, etc.

40 El sistema de administración dirigido a las mitocondrias puede proporcionarse de acuerdo con la realización de la presente divulgación que puede comprender uno cualquiera de los conjugados mencionados anteriormente, en el que el péptido vehículo se mueve localmente hacia las mitocondrias intracelulares y desempeña un papel de administración de los principios activos mencionados a las mitocondrias intracelulares locales, en donde el péptido que tiene más del 80 % de homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia mencionada anteriormente y el fragmento de la misma son los péptidos que mantienen el sistema de suministro dirigido a las mitocondrias, el péptido dirigido a mitocondrias mencionado anteriormente puede ser el péptido que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6.

45 Puede proporcionarse la composición de ajuste de la actividad mitocondrial, en la que la composición comprende un conjugado de un péptido de la invención y un péptido transportado para el suministro, en el que el péptido vehículo se mueve localmente hacia las mitocondrias intracelulares y desempeña un papel de administración de los principios activos mencionados a las mitocondrias intracelulares locales, en donde el péptido que tiene más del 80 % de homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia mencionada anteriormente y el fragmento de la misma son los péptidos que mantienen el sistema de suministro dirigido a las mitocondrias, el péptido dirigido a mitocondrias mencionado anteriormente puede ser la composición que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6.

55 La composición de ajuste de la actividad mitocondrial de acuerdo con una realización de la presente divulgación, en la que la composición para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con las mitocondrias, la prevención, la inhibición del progreso o el alivio de los síntomas como una composición farmacéutica, en la que el principio activo se tratará para una enfermedad o trastorno relacionado con las mitocondrias, la prevención, la

inhibición del progreso o el alivio de los síntomas.

Las "enfermedades relacionadas con las mitocondrias" desveladas en el presente documento comprenden enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, MELAS (Encefalomiopatía mitocondrial con acidemia láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares); MERRF (mioclono, epilepsia y miopatía con fibras rojas irregulares; NARP/MILS (debilidad muscular neurogénica, ataxia, retinitis pigmentosa/síndrome de Leigh heredado de la madre); LHON (neuropatía óptica hereditaria de Lebers); KSS (Síndrome de Kearns-Sayre); PMPS (Síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson); CPEO (oftalmoplegia externa progresiva crónica); Síndrome de Reye; Síndrome de Alper; Síndrome de delección de ADNmt múltiple; síndrome de agotamiento de ADNmt; Deficiencia del complejo I; Deficiencia del complejo II (SDH); Deficiencia del complejo III; Deficiencia de citocromo c oxidasa (COX, complejo IV); Deficiencia de complejo V; Deficiencia de translocador de nucleótidos de adenina (ANT); Deficiencia de piruvato deshidrogenasa (PDH); Aciduria del ácido etilmalónico con acidemia de ácido láctico; Aciduria de ácido 3-metil glutacónico con acidemia de ácido láctico; epilepsia refractaria que representa una disminución durante la infección; Síndrome de Asperger que representa una disminución durante la infección; Autismo que representa una disminución durante la infección; trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH); Parálisis cerebral que representa una disminución durante la infección; Alexia que representa una disminución durante la infección; Trombocitopenia hereditaria materna; Leucemia; MNGIE (miopatía mitocondrial, neuropatía periférica y autonómica, disfunción gastrointestinal y epilepsia); Síndrome de MARIAHS (ataxia mitocondrial, infección recrudesciente, afasia, hipouricemia/hipomielinización, convulsiones y aciduria de ácido dicarboxílico); Distonía ND6; Síndrome de vómitos cíclicos que representa una disminución durante la infección; Aciduria de ácido 3-hidroxisobutírico que tiene acidemia de ácido láctico; Diabetes con acidemia de ácido láctico; Síndrome neural reactivo de uridina (URNS); Necrosis del estriado bilateral familiar (FBSN); Pérdida auditiva relacionada con aminoglucósidos; Miocardiopatía relajada; Linfoma de bazo; Síndrome de Wolframs; Síndrome de delecciones de ADN de mitocondrias múltiples; y Síndrome de acidosis tubular renal/diabetes/ataxia, pero no limitado a esos.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente. Las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, tienen secuencias de bases de GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA (Número de secuencia 181). Los ácidos nucleicos pueden introducirse en la célula hospedadora de acuerdo con un procedimiento conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los procedimientos conocidos pueden ser el procedimiento de transformación por el procedimiento de fosfato de calcio, liposoma, electroporación, poniendo en contacto un virus y una célula o microinyección directamente en la célula, etc. La célula hospedadora es una célula eucariota superior, por ejemplo, células de mamífero, o células eucariotas inferiores, tales como una célula de levadura, o células procariotas, tales como una célula bacteriana. Las células hospedadoras procariotas apropiadas para la transformación pueden ser las especies que pertenecen a *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y especies de microbacterias, como ejemplos.

El vector que incluye las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente es generalmente un vector de expresión recombinante y comprende, el origen de replicación que permite una transformación de la célula hospedadora y un marcador seleccionable (por ejemplo, dihidrofolato reductasa para el cultivo de células eucariotas o tolerancia a neomicina, tolerancia a tetraciclina o a ampicilina en *E. coli* o el gen TRP1 de *S.cerevisiae*) y el promotor para controlar la transcripción de secuencias de recubrimiento de proteínas. Los vectores de expresión disponibles son, por ejemplo, plásmidos bacterianos conocidos tales como SV40, derivados de pcDNA y plásmidos bacterianos conocidos tales como colE1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith, y col., Gene 67:31-40(1988)), plásmidos tales como pMB9 y su derivado RP4, ADN de fago que es lo mismo que numerosos derivados del fago I tales como NM989, ADN de fago tales como M13 y ADN de fago monocatenario de tipo filamento; plásmido de levadura, por ejemplo, ADN o vector de fago inducido a partir de una combinación de plásmido modificado para usar secuencias de supresión de expresión y ADN de fago. Los vectores de expresión de mamíferos comprenden el origen de replicación, un promotor apropiado y un potenciador. Además, pueden comprender sitios obligatorios de unión a ribosomas, sitios de poliadenilación, donador de empalme y parte del receptor, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcripcionales de entablado 5'. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un promotor inducible, por ejemplo, un vector que contiene el promotor de dihidrofolato reductasa, cualquier vector de expresión que contenga casete de expresión DHFR o vector de coamplificación DHFR/metotrexato tales como pED (Randal J, kaufman, 1991, Randal J. Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16, 12(1991)). O, el vector de co-amplificación de glutamina sintetasa/metionina sulfoximina, por ejemplo, pEE14 (Celltech), Virus Epstein-Barr (VEB) o un vector que dirige la expresión episómica bajo el control del antígeno nuclear (EBNA), por ejemplo, pueden usarse pREP4 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMEP4 (Invitrogen), pREP8 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen) y pEBVHis (Invitrogen). Los vectores de expresión de mamíferos seleccionables son Rc/CMV (Invitrogen) y pRc/RSV (Invitrogen), etc. Los vectores de expresión de mamíferos del virus vacuna que pueden usarse en la presente invención son pSC11, pMJ601, pTKgptF1S, etc.

El sistema de vector de expresión de levadura que se usará en la presente invención es el vector pYES2 sin fusión (Invitrogen), pYESHisA, B, C de fusión (Invitrogen), vector pRS, etc.

Los vectores mencionados anteriormente pueden introducirse en diversas células, tales como células de mamíferos que son especialmente las células derivadas de humanos, o bacterias, levaduras, hongos, insectos, nematodos y

células vegetales. Los ejemplos de células apropiadas son células VERO, células HeLa, por ejemplo, N.º de ATCC CCL2, línea celular CHO, por ejemplo, N.º de ATCC CCL61, células COS, por ejemplo célula COS-7 y célula N.º de ATCC CRL 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, por ejemplo, N.º de ATCC CRL6361, A549, PC12, célula K562, célula 293, célula Sf9, por ejemplo, N.º de ATCC CRL1711 y célula Cv1, tales como N.º de ATCC CCL70, etc.

- 5 Otras células apropiadas para su uso en la presente invención son cepas de células hospedadoras procariontas, por ejemplo, las cepas pertenecientes a *E. coli* (por ejemplo, cepa DH5- α), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

10 En una realización de la presente divulgación, la composición puede contener 0,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 1 mg/mg , específicamente 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 0,5 mg/mg , más específicamente 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 0,1 mg/mg de un péptido que comprende una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos por encima del 80 % de homología con la secuencia anteriormente mencionada o un fragmento del péptido anteriormente mencionado. Cuando el péptido está contenido en el intervalo mencionado anteriormente, toda la seguridad y estabilidad de la composición puede satisfacerse y ser apropiada en términos de rentabilidad.

- 15 En una realización de la presente divulgación, la composición puede tener aplicación con todos los animales incluyendo humano, perro, pollo, cerdo, vaca, oveja, cobaya y mono.

En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede administrarse a través de vía oral, rectal, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, en la médula ósea, por medios epidurales o subcutáneos.

- 20 Las formas de administración oral pueden ser, pero no se limitan a, comprimidos, píldoras, cápsulas blandas o duras, gránulos, polvos, solución o emulsión. Las formas de administración no oral pueden ser, pero no se limitan a, inyecciones, goteos, lociones, pomadas, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, supositorio, parche o pulverizador.

25 En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica, si es necesario, puede contener aditivos, tales como diluyentes, excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, tampones, dispersantes, tensioactivos, agentes colorantes, aromáticos o edulcorantes. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede fabricarse por procedimientos convencionales de la industria en la técnica.

30 En una realización de la presente invención, el principio activo de la composición médica puede variar de acuerdo con la edad del paciente, el sexo, el peso, la patología y el estado, la vía de administración o el juicio del prescriptor. La dosificación basada en estos factores se determina dentro de los niveles de los expertos en la materia y la dosis diaria, por ejemplo, puede ser, pero no se limita a, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 1 $\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, específicamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, más específicamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, más específicamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En una realización de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede administrarse, pero no se limita a, 1 a 3 veces al día.

35 En una realización de la presente divulgación, la composición cosmética puede proporcionarse en todas las formas apropiadas para aplicaciones tópicas. Por ejemplo, las formas pueden proporcionarse como soluciones, emulsiones obtenidas por dispersión de fase oleaginoso en agua, emulsión obtenida por dispersión de agua en fase oleaginoso, suspensión, sólido, gel, polvo, pasta, espuma o aerosol. Estas formas pueden fabricarse por procedimientos convencionales de la industria en la divulgación de la técnica.

40 En una realización de la presente divulgación, la composición cosmética puede incluir, dentro de niveles que no dañarán el efecto principal, otros ingredientes que pueden aumentar deseablemente el efecto principal. En una realización de la presente invención, la composición cosmética puede incluir adicionalmente humectante, agentes emolientes, tensioactivos, absorbentes de UV, conservantes, fungicidas, antioxidantes, agente de ajuste de pH, pigmentos orgánicos o inorgánicos, aromáticos, agente refrigerante o antitranspirante. Los expertos en la materia pueden decidir la proporción de formulación de los ingredientes mencionados anteriormente dentro de niveles que no perjudiquen el fin y los efectos de la presente invención, y la proporción de formulación basada en el peso total de la composición cosmética puede ser del 0,01 al 5 % en peso, específicamente del 0,01 al 3 % en peso.

50 En una realización de la presente divulgación, la composición alimentaria no se limita a las formas, pero por ejemplo pueden ser gránulos, polvo, formas líquidas y sólidas. Cada forma puede formarse con ingredientes comúnmente usados en la industria elegidos apropiadamente por los expertos en la materia, además del principio activo, y puede aumentar el efecto con otros ingredientes.

55 La decisión de dosificación sobre el principio activo mencionado anteriormente está dentro del nivel de los expertos en la materia y la dosificación diaria por ejemplo puede ser de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, más específicamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, más específicamente los 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, pero no se limita a estos números y puede variar de acuerdo con la edad, el estado de salud, complicaciones y otros diversos factores.

Los términos usados en el presente documento pretenden usarse para describir las realizaciones, no para limitar la

presente invención. Los términos sin números delante no son para limitar la cantidad, sino para mostrar que puede haber más de una cosa del término usado. Las expresiones "que incluye", "que tiene", "que consiste" y "que comprende" se interpretarán abiertamente (es decir, "incluyendo pero no limitado a").

5 Se usa la mención del intervalo de números en lugar de indicar números separados dentro del intervalo, así que a menos que se indique explícitamente, cada número puede leerse como números separados integrados en el presente documento. Los valores finales de todos los intervalos se incluyen en el intervalo y pueden combinarse de forma independiente.

10 A menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente en contexto, todos los procedimientos mencionados en el presente documento pueden realizarse en el orden apropiado. El uso de una realización cualquiera y todas las realizaciones o lenguaje ejemplar (por ejemplo, que usa "como ~"), a menos que esté incluido en las reivindicaciones, se usa para describir más claramente la presente invención, no para limitar el ámbito de la presente invención. Cualquier lenguaje en el presente documento fuera de las reivindicaciones no debe interpretarse como una necesidad de la presente invención. A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen un significado normalmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

15 Las realizaciones preferidas de la presente invención son el mejor modo conocido por los inventores para realizar la presente invención. Puede resultar claro para los expertos en la materia después de leer las declaraciones antes de las variaciones en las realizaciones preferidas. Los presentes inventores esperan que aquellos expertos en la materia puedan usar las variaciones adecuadamente y que la presente invención se lleve a cabo de otras maneras distintas a las listadas en el presente documento. Por lo tanto, la presente invención, según lo permitido por la ley de patentes, incluye equivalentes y variaciones de los mismos, de los puntos clave de la invención establecidos en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Síntesis de péptido

25 Los péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento existente de síntesis de péptidos en fase sólida. En detalle, los péptidos se sintetizaron acoplando cada aminoácido del C-terminal a través de la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc, SPPS, usando ASP48S (Peptron, Inc., Daejeon ROK). Los péptidos con su primer aminoácido en el C-terminal uniéndose a la resina se usaron de la siguiente manera:

30 Resina NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-tritilo
Resina NH₂-Ala-2-cloro-tritilo
Resina NH₂-Arg(Pbf)-2-cloro-tritilo

Todos los materiales de aminoácidos para sintetizar el péptido estaban protegidos por Fmoc en el N-terminal y los restos de aminoácidos estaban protegidos por Trt, Boc, t-Bu (t-butiléster), Pbf (2,2,4,6,7-pentametil dihidrobenzofuran-5-sulfonilo) que pueden disolverse en ácido. Tales como:

35 Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, ácido Trt-Mercaptoacético.

40 HBTU[2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetametilaminio hexafluorofosfato]/HOBt [N-hidroxibenzotriazol]/NMM[4-metilmorfolina] se usaron como reactivos de acoplamiento. En el 20 % de DMF, se usó piperidina para retirar Fmoc. Para retirar la protección del resto o para separar el péptido sintetizado de la resina, se usó cóctel de escisión [TFA (ácido trifluoroacético)/TIS (triisopropilsilano)/EDT (etanoditiol)/H₂O = 92,5/2,5/2,5/2,5].

Los péptidos se sintetizaron usando el armazón de fase sólida añadiendo cada aminoácido con los procedimientos secuenciales como sigue; protección de aminoácidos, reacción de acoplamiento, lavado y desprotección. Después de cortar el péptido sintetizado de la resina, se purificó por HPLC y se verificó la síntesis por MS y después se secó por congelación.

45 El procedimiento de síntesis de péptidos específico se describe mediante el ejemplo de Pep1(EARPALLTSRLRFIPK) de SEQ ID NO: 7 como sigue:

1) Acoplamiento

50 El aminoácido (8 equivalentes) protegido con Resina NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-tritilo se fundió en el agente de acoplamiento HBTU (8 equiv.)/HOBt (8 equiv.)/NMM (16 equiv.) y tras la adición de DMF, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF.

2) Desprotección de Fmoc

Después de la adición de piperidina al 20 % en DMF, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos 2 veces, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF.

3) Fabricar el marco básico del péptido repitiendo las reacciones 1 y 2 repetidamente.

- 4) Escisión: Añadir el Cóctel de Escisión al péptido completamente sintetizado y separar el péptido de la resina.
- 5) Añadir éter dietílico pre-enfriado a la mezcla y después centrifugar la mezcla de reacción para precipitar los péptidos.
- 6) Después de la purificación por Prep-HPLC, comprobar el peso molecular por CL/EM y liofilizar para obtener los péptidos en forma de polvo.

Ejemplo 2: Preparación de conjugado pep(CPP)-FITC

(1) Preparación del conjugado pep(CPP)-FITC

Un conjugado de los péptidos con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 combinado con FITC se fabricó como sigue, por ejemplo, un conjugado de pep1 con SEQ ID NO: 7 y FITC, en otras palabras, se fabricó FITC-enlazador-pep1 como sigue.

El marco básico del péptido, (Resina NH₂-enlazador-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-Tritilo) que se obtuvo de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en el Ejemplo 1, se hizo reaccionar con FITC. Específicamente, FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) (8 equivalentes) y DIPEA (N, N-diisopropiletilamina) (16 equivalentes) se fundieron en DMF. Se añadió la solución de DMF y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF. Como resultado, se obtuvo la resina FITC-enlazador-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-tritilo. El enlazador en el presente documento es ácido 6-aminohexanoico, Ahx. Se añadió TFA/TIS/H₂O = 95/2,5/2,5 al péptido fabricado sobre la resina y el conjugado se separó de la resina. Se añadió un éter dietílico pre-enfriado a la mezcla obtenida y se usó centrifugación para precipitar los conjugados peptídicos. Después de la purificación por Prep-HPLC, la pureza se confirmó con la HPLC analítica y el peso molecular se determinó por CL/EM. El péptido sintetizado como se describió anteriormente se verificó como FITC-pep1 mediante la confirmación del peso molecular por CL/EM. Después los conjugados se liofilizaron.

(2) Preparación de un conjugado CPP-FITC

El marco básico del péptido, (Resina NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-cloro-Tritilo) se generó de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en el Ejemplo 2 1. (1). Para introducir selectivamente FITC al C-terminal del péptido, el N-terminal del péptido estaba protegido de Boc. Después, el di-*terc*-dicarbonato de butilo (30 equivalentes) y DIPEA (30 equivalentes) se fundieron en DMF. La solución de DMF se añadió al péptido y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y el péptido se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF. Como resultado, se obtuvo la resina Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-cloro-tritilo. Se usó hidrazina en 2 % de DMF para retirar Dde, que es el grupo protector del resto Lys C-terminal para añadir FITC al C-terminal de Lys. Después, FITC (8 equivalentes) y DIPEA (16 equivalentes) se fundieron en DMF que se añadió a la mezcla de reacción peptídica y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH, DMF. Como resultado, se obtuvo la resina Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(FITC)-2-cloro-tritilo. Se añadió TFA/TIS/H₂O = 95/2,5/2,5 para separar el péptido de la resina. Se añadió éter dietílico preenfriado a la mezcla, y se usó centrifugación para precipitar los péptidos. Después de la purificación por Prep-HPLC, La pureza se confirmó con la HPLC analítica y el peso molecular se confirmó con CL/EM. Las sustancias obtenidas se verificaron como pep1-FITC mediante la confirmación del peso molecular por CL/EM.

Ejemplo 3: Preparación y purificación de la proteína de fusión pep(CPP)-EGFP

La proteína de fusión para los péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 y proteína fluorescente verde mejorada (proteína fluorescente verde mejorada, EGFP) (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10) se fabricaron de la siguiente manera:

(1) preparación de clones de ADN recombinante de pET21a-EGFP-etiqueta-His

Para clonar el vector pEGFP-N1 como el molde de proteína fluorescente verde mejorada (proteína fluorescente verde mejorada, EGFP) en el vector pET21a(+) (Novagen) que contiene una endonucleasa de restricción para producir una secuencia de bases cebadora que se muestra en la Tabla 3.

[TABLA 3]

Número de ID de secuencia	Cebador	Secuencia	Longitud (pb)
11	EGFP-F	ATATACATAAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG A	34
12	EGFP-R	GTGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA GAGTGAT	39

ES 2 743 919 T3

El cebador EGFPF (directo) contenía sitios de restricción de NdeI y EcoRI y se diseñó para añadirse a 20 números de secuencias de EGFP, el cebador EGFP-R (inverso) contenía sitios de restricción de XhoI, y que se diseñó para añadirse a 30 números de secuencias de EGFP.

5 Para la amplificación génica, se añadieron 100 pmol de cebador y 2,5 U de ADN polimerasa Taq a 50 µl de Tris cloruro de hidrógeno (Tris-HCl, pH 9,0) suplementado con cloruro de potasio 50 mM, triton X-100 al 0,1 %, cloruro magnésico 1,5 mM y 150 µM para cuatro tipos de desoxirribonucleótido trifosfato (ATP, dTTP, dGTP, dCTP). Después, la PCR se realizó usando el ADN plasmídico pEGFP de 10 ng como molde como sigue; desnaturalización para el ADN plasmídico pEGFP a 95 °C durante 5 minutos, cambio de temperatura a 95 °C durante 30 segundos, a 46 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 45 segundos, 30 ciclos desde la realización de una reacción en
10 cadena de la polimerasa y la amplificación se confirmó por electroforesis en gel de agarosa de los productos.

Se clonaron endonucleasas de restricción NdeI y XhoI que se presentan en un sitio de clonación múltiple (sitio de clonación múltiple, MCS) de Pet21a.

(2) preparación de clones de ADN recombinante de pET21a-pep(CPP)-EGFP-Etiqueta-His

15 Para obtener la proteína de fusión pep(CPP)-EGFP-etiquetaHis de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, se construyeron secuencias de cebador como en la Tabla 4.

[TABLA 4]

Número de secuencia	Cebador	Secuencia	Longitud (pb)
13	pep73-F	TATGGTGTATGGCTTTGTGCGCGCGTGCCTGCGCCGCCTGG TGCCGCGGGCCTGTGGGGCAGCG	65
14	pep73-R	AATTCGCTGCCCCACAGGCCCGGGCACCAGGCGGGCGCA GGCACGCGCGCACAAAGCCATACACCA	67
15	pep84-F	TATGCTGGGCCTGGATGATATTCATCGCGCGTGGCGCACCT TTGTGCTGCGCGTGCAGCGCAGG	65
16	pep84-R	AATTCCTGCGCGCGCACGCGCAGCACAAAGGTGCGCCACG CGCGATGAATATCATCCAGGCCAGCA	67
17	pep98-F	TATGAACCGCGGCTTTAAAGCGGGCCGCAACATGCGCCGCA AACTGTTTGGCGTGTGCGCCTGG	65
18	pep98-R	AATTCAGGCGCAGCACGCCAAACAGTTTGGCGCGCATGTT GCGGCCCGCTTTAAAGCCGCGTTCA	67
19	pep14 4-F	TATGAGCATTATTAACCGCAGAACACCTATTGCGTGCGCCG CTATGCGGTGGTGCAGAAAGCGG	65
20	pep14 4-R	AATTCGGCTTTCTGCACCACCGCATAGCGGCGCACGCAATA GGTGTCTGCGGTTTAATAATGCTCA	67
21	pep15 5-F	TATGCGCACCAGCATTGCGCGAGCCTGACCTTTAACCGCG GCTTTAAAGCGGGCCGCAACATGG	65
22	pep15 5-R	AATTCATGTTGCGGCCCGCTTTAAAGCCGCGGTTAAAGGTC AGGCTCGCGCAATGCTGGTGCAGCA	67
23	pep-RIA-148-F	TATGCTGCTGACCAGCCGCTGCGCTTG	29
24	pep-RIA-148-R	AATCAAAGCGCAGGCGGCTGGTCAGCAGCA	31

Cada cebador F (directo) contenía sitios de restricción de NdeI y se diseñó para añadirse a la secuenciación de ADN pep(CPP) de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, cada cebador R (inverso) contenía sitios de restricción de EcoRI y se diseñó para añadirse a la secuenciación de ADN pep(CPP) de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6.

Para la síntesis de oligonucleótidos, se añadieron 10 μM de cada cebador F-R en una solución de 500 μl suplementada con Tris cloruro de hidrógeno 10 mM (Tris-HCl, pH 7,5-8,0), cloruro potásico 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM. Después, la PCR se realizó de la siguiente manera; desnaturalización de cebadores a 95 °C durante 2 minutos, reducción de temperatura lentamente a la reacción a 25 °C durante 45 minutos y almacenamiento a 4 °C.

El producto de oligonucleótido sintetizado se restringió por las enzimas de restricción NdeI y EcoRI y se clonó en sitios de restricción NdeI y EcoRI de clones de ADN de recombinación pET21a-EGFP-etiqueta-His, después se construyeron clones de ADN de recombinación pET21a-pep(CPP)-etiqueta-His de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 (Figura 1)

(3) preparación y purificación de la proteína de fusión

Los clones de ADN de recombinación pET21a-EGFP-etiqueta-His y los clones de ADN de recombinación pET21a-pep(CPP)-Etiqueta-His de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 se transformaron en bacterias y se purificó la proteína. En particular, se transformaron usando el E. coli BL21 (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se hicieron crecer en 5 ml de medio LB/ampicilina, después se movieron a incubación en 100 ml de medio. Para este caso, se añadió una proporción de ampicilina de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Continuamente, se agitó el cultivo durante 2 a 3 horas a 37 °C y se midió la absorbancia del crecimiento hasta intervalos de 0,6 a 0,8. Para la expresión de la proteína de fusión, se trató IPTG 0,1 mM ~ 1 mM (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) y las células se cultivaron adicionalmente durante 3 a 16 horas de 16 °C a 37 °C y después se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm.

El resultado para el centrifugado de proteína expresada, confirma visualmente que las células pueden tomar una luz verde cuando se sobreexpresan. Además, el kit de purificación de etiqueta His, Kit de aislamiento de proteínas Ni-TAT (Prod, n.º. 31314, QuiagenUSA) para separarse según lo indicado por el fabricante.

Después de la separación y purificación por diálisis de la proteína, se concentra. En particular, la diálisis se usa por PBS esterilizado. En primer lugar, después de la bolsa de diálisis previamente equilibrada con PBS, y después se usa una jeringa de 5 ml dada en este punto colocada en bolsas de diálisis toma una solución de proteína separada anteriormente y dializada durante la noche a 4 °C con agitación. Después de eliminar los materiales no deseados para aumentar la concentración de la proteína, BIBASPIN 20 (Prod, n.º VS2092, Sartorius Stedin biotech, Alemania) en la proteína dializada se concentra de una manera que se centrifuga a 4 °C a 3.000 rpm.

Ejemplo 4: Penetración celular experimental del conjugado pep(CPP)-FITC

(1) Penetración celular experimental de la línea celular HeLa

Cultivo celular

La línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino de Homo sapiens como líneas celulares HeLa se adquirieron de ATCC (American Type Cell Culture). Las células se cultivaron en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), sales de Earle, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina y 10 unidades/ml de estreptomycin y se cultivaron a 37 °C, en una incubadora de CO₂ al 5 %.

Análisis de citometría de flujo y microscopía confocal de penetración celular

La citometría de flujo y el análisis de microscopio confocal se realizaron para comparar el grado de captación celular de las células que se trataron con la SEQ ID NO: 1 con la SEQ ID NO: 6, pep (CPP) y control.

La línea celular se dividió en una placa de 6 pocillos y se cultivó en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomycin a 37 °C, incubadora al 5 % de CO₂ durante 12 horas. Después de lavar la línea celular con PBS, se indujeron ayunas en Medio Esencial Mínimo durante una hora. Se trataron 20 μM de cada péptido vehículo y se cultivaron a 37 °C durante una hora. Después de repetir la etapa de lavar las células con PBS tres veces, se trató con tripsina-EDTA durante 10 minutos a 37 °C para separar el péptido vehículo en el exterior de la célula. Las células se recogieron con PBS refrigerado y se realizó una centrifugación para repetir la etapa de lavar las células tres veces. Después de eso, las células se suspendieron en 0,5 ml de PBS que contenía 4 % de paraformaldehído y se analizó la fluorescencia de las células usando FACS Calibur (Becton Dickinson). Se comparó el aspecto de la captación celular del control y diversos péptidos combinados con FITC y se analizó por IFM (Intensidad de fluorescencia media).

La línea celular cultivada se dividió en un pocillo de cámara y se cultivó en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina y 100 unidades/ml de estreptomycin a 37 °C, incubadora al 5 % de CO₂ durante 12 horas. Después de lavar las células con PBS, se indujeron ayunas en Medio Esencial Mínimo durante una hora. Se trataron 10 μM de cada péptido y se cultivaron a 37 °C durante una hora. Después de repetir la etapa de lavar las células con PBS 3 veces, las células se fijaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en paraformaldehído al 2 % (v/v). El núcleo se tiñó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a temperatura ambiente y las células se compararon y analizaron mediante análisis de microscopio confocal. El resultado es el mismo que se muestra en la Figura 2 a la Figura 7.

(2) Propiedad de penetración celular de la línea celular Huh7

Cultivo celular

5 La línea celular de carcinoma hepatocelular humano como líneas Huh7 se adquirió de ATCC (American Type Cell Culture) y se usó como células suspendidas. Las células se cultivaron en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), sales de Earle, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico y 100 µg/ml de penicilina y 10 unidades/ml de estreptomycin y se cultivaron a 37 °C, en una incubadora de CO₂ al 5 %.

El análisis de detección de penetración celular usado por citometría de flujo

10 Para confirmar la penetración celular de los péptidos, las líneas celulares Huh7 se trataron con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 y se analizaron por citometría de flujo. El procedimiento analizado también se confirmó de la misma manera que se describió anteriormente en el ejemplo (1) en líneas celulares Hela. Además, El resultado se mostró en la Figura 8 a la Figura 11.

(3) Penetración celular experimental en líneas celulares de linfocitos T humanos

Cultivo celular

15 La línea celular de leucemia de linfocitos T humanos como Jurkat se adquirió de ATCC (American Type Cell Culture) y se usó como células suspendidas. Las células se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), sales de Earle, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico y 100 µg/ml de penicilina y 10 unidades/ml de estreptomycin y se cultivaron a 37 °C, en una incubadora de CO₂ al 5 %. Los linfocitos derivados de humanos (linfocitos) se separaron de la sangre humana sana (50 ml) y después se recogió la capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los linfocitos se usaron mediante solución de separación Biocoll (Biochrom AG, Berlín, Alemania).

El análisis de detección de penetración celular usado por citometría de flujo

25 Para confirmar la penetración celular de los péptidos, las líneas celulares de leucemia de linfocitos T humanos se trataron con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 y se analizaron por citometría de flujo. El procedimiento analizado también se confirmó de la misma manera que se describió anteriormente en el ejemplo (1) en líneas celulares Hela. Además, El resultado se mostró en la Figura 12 a la Figura 15.

(4) Análisis de viabilidad celular y toxicidad

30 Las líneas celulares Hela se cultivaron de la misma manera que se describe anteriormente, que se dividieron en una placa de 96 pocillos y se cultivaron en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), 100 µg/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomycin a 37 °C, incubadora al 5 % de CO₂ durante 12 horas. Después de lavar la línea celular con PBS, se indujeron ayunas en Medio Esencial Mínimo durante una hora. Se trataron 20 µM de cada péptido vehículo y se cultivaron a 37 °C durante una hora. Después de cultivar las células, se analizó la viabilidad celular y la toxicidad usada por el ensayo MTT. Los resultados se mostraron en la Figura 16 a la Figura 21.

Ejemplo 5: Penetración celular experimental de la proteína de fusión pep(CPP)-EGFP

35 Cultivo celular

La línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino de Homo sapiens como líneas celulares HeLa se adquirieron de ATCC (American Type Cell Culture). Las células se cultivaron en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), sales de Earle se obtuvieron de ATCC (American Type Cell Culture). Las células se cultivaron en péptido MEM, se trataron y se cultivaron a 37 °C, en una incubadora de CO₂ al 5 %.

40 Análisis de citometría de flujo y microscopía confocal de penetración celular

El gen indicador como proteína fluorescente verde mejorada (proteína fluorescente verde mejorada, EGFP) se combinó con los péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 para preparar la proteína de fusión y tratarla en líneas celulares. Se realizó un análisis de citometría de flujo y microscopio confocal para comparar el grado de absorción celular de las células que se trataron con proteína de fusión pep(CPP)-EGFP y proteína EGFP.

45 La línea celular se dividió en 12 placas y se cultivó en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), 100 µg/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomycin a 37 °C, incubadora al 5 % de CO₂ durante 12 horas. Después de lavar la línea celular con PBS, se indujeron ayunas en Medio Esencial Mínimo durante una hora. Se trataron 20 µM de cada péptido vehículo y se cultivaron a 37 °C durante una hora. Las células se lavaron con PBS tres veces, se trataron con tripsina-EDTA a 37 °C durante una hora. La proteína de fusión pep(CPP)-EGFP se retiró del exterior de la célula. Las células recogidas se usaron con PBS congelado y se lavaron tres veces por centrifugado. Después del centrifugado, se usaron después 0,5 ml de PBS que contenía 4 % de paraformaldehído a células suspendidas y se analizó FACS Calibur (Becton Dickinson). Se realizó IFM (intensidad de fluorescencia

media) para comparar el grado de captación celular de entre las células que se trataron con proteína de fusión pep(CPP)-EGFP y proteína EGFP.

Las líneas celulares cultivadas anteriores se dividieron en pocillos de cámara y se cultivaron en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), 100 µg/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomycin a 37 °C, incubadora al 5 % de CO₂ durante 12 horas. Después de lavar la línea celular con PBS, se indujeron ayunas en un Medio Esencial Mínimo durante dos horas. Las células se lavaron con PBS tres veces y se fijaron con Paraformaldehído al 2 % (v/v) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de fijarse, se usó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para teñir el núcleo a temperatura ambiente y se analizó por microscopía confocal. Los resultados se mostraron en la Figura 22 a la Figura 27.

10 [Texto previo de la lista de secuencias]

SEQ ID NO: 9
Sec. de proteína EGFP (239.a)

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTG
KLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY
KTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKV
NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MV
LLEFVTAAGITLGMDELYK

15 SEQ ID NO: 10
Sec. de nucleótidos EGFP (717 pb)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG
GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC
GGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG
TGCAAGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAG
TCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA
CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTG
AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGG
GGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGAC
AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA
GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

<110> KAEL-GemVax Co., Ltd. KIM, Sangjae

<120> Péptido de penetración celular y conjugado y composición que comprende el mismo

<130> 0F13P180/TW

20 <150> KR10-2012-0104144

ES 2 743 919 T3

<151> 19-09-2012
<150> KR10-2012-0109216
<151> 28-09-2012
5 <150> KR10-2013-0017046
<151> 18-02-2013
<150> KR10-2013-0017169
<151> 18-02-2013
<160> 24
<170> Patent In versión 3.2
10 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Val Tyr Gly Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly
1 5 10 15
Leu Trp Gly Ser
15 20
<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 2
Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg
1 5 10 15
Val Arg Ala Gln
20
<210> 3
<211> 20
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<400> 3
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
1 5 10 15
Val Leu Arg Leu
20
<210> 4
<211> 20
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<400> 4
Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val
1 5 10 15
Val Gln Lys Ala
20
35 <210> 5
<211> 20
<212> PRT

ES 2 743 919 T3

<213> Homo sapiens

<4> 5

Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala
 1 5 10 15
 Gly Arg Asn Met
 20

<210> 6

5

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5

<210> 7

10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15

15

<210> 8

<211> 1132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

20

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

ES 2 743 919 T3

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
225 230 235 240

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
260 265

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
465 470 475 480

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
500 505 510

Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
565 570 575

ES 2 743 919 T3

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
580 585 590

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
625 630 635 640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
660 665 670

Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser
930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
965 970 975

ES 2 743 919 T3

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
980 985 990
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
995 1000 1005
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln
1010 1015 1020
Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
1025 1030 1035 1040
Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
1045 1050 1055
Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
1060 1065 1070
Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
1075 1080 1085
Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
1090 1095 1100
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
1105 1110 1115 1120
Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
1125 1130

<210> 9

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteina fluorescente verde

<400> 9

ES 2 743 919 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 10
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteina fluorescente verde
 <400> 10

ES 2 743 919 T3

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctctgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggta agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcataaggg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcgcc gacggccccc tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgcc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgoga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaag 717

5 <210> 11
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> EGFP-F

10 <400> 11
 atatacataa attcatggtg agcaagggcg agga 34

<210> 12
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> EGFP-R

<400> 12
 gtgctcgagc ttgtacagct cgtccatgcc gagagtgat 39

20 <210> 13
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pep73-F

<400> 13

tatggtgat ggctttgtgc gcgctgcct gcgccgctg gtgccgccc gcctgtggg 60
 cagcg 65

25 <210> 14
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> pep73-R

<400> 14

ES 2 743 919 T3

	aattcgtgc cccacaggcc cggcggcacc aggcggcgca ggcacgcgcg cacaaagcca	60
	tacacca	67
5	<210> 15 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pep84-F <400> 15	
	tatgctgggc ctggatgata ttcatcgcg gtggcgcacc tttgtgctgc gcgtgcgcg	60
	gcagg	65
10	<210> 16 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pep84-R <400> 16	
15	aattcctgcg cgcgcacgcg cagcacaag gtgcgccacg cgcgatgaat atcatccagg	60
	cccagca	67
20	<210> 17 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pep98-F <400> 17	
	tatgaaccgc ggctttaag cgggccgcaa catgcgccgc aaactgtttg gcgtgctgcg	60
25	cctgg	65
30	<210> 18 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pep98-R <400> 18	
	aattccagcg gcagcagccc aaacagtttg cggcgcatgt tgcggcccgc tttaaagccg	60
	cggttca	67
35	<210> 19 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pep144-F	

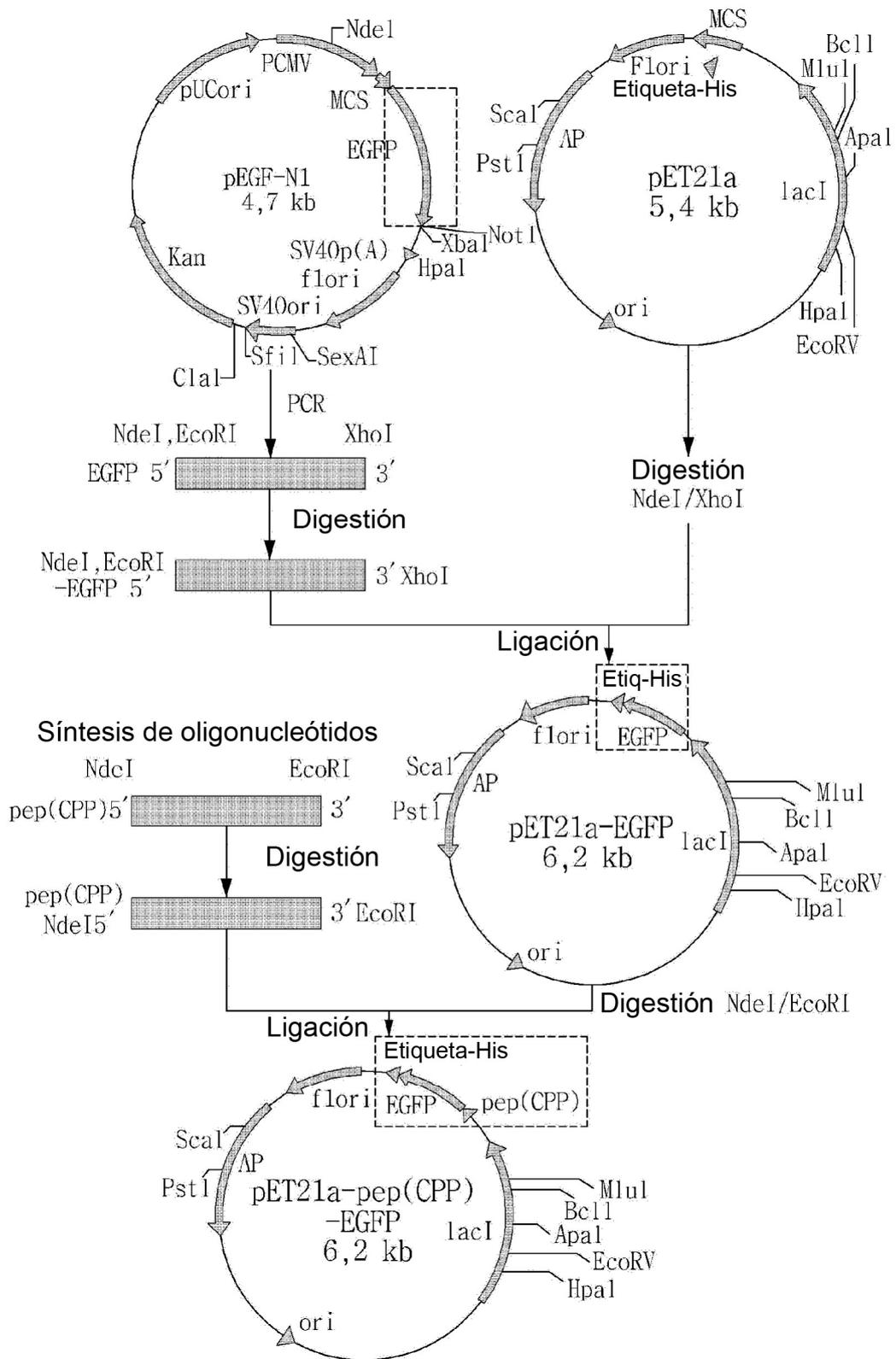
ES 2 743 919 T3

	<400> 19		
		tatgagcatt attaaaccgc agaacaccta ttgcgtgcgc cgctatgcgg tgggtcagaa	60
		agcgg	65
5	<210> 20 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> pep144-R		
	<400> 20		
		aattccgctt tctgcaccac cgcatagcgg cgcacgcaat aggtgttctg cggtttaata	60
10		atgctca	67
	<210> 21 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> pep155-F		
	<400> 21		
		tatgcgacc agcattcgcg cgagcctgac cttaaccgc ggctttaaag cgggccgcaa	60
		catgg	65
20	<210> 22 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> pep155-R		
25	<400> 22		
		aattccatgt tgcggcccgc ttaagccg cggttaaagg tcaggctcgc gcaatgctg	60
		gtgcgca	67
30	<210> 23 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> pep-RIA-148-F		
	<400> 23		
		tatgctgctg accagccgcc tgcgcttg	29
35	<210> 24 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> pep-RIA-148-R		
40	<400> 24		
		aattcaaagc gcaggcggct ggtcagcagc a	31

REIVINDICACIONES

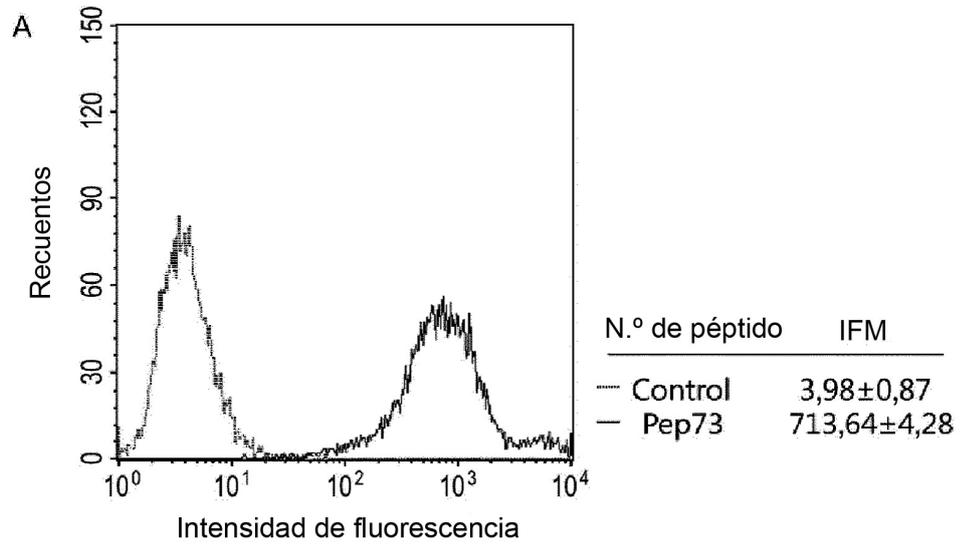
1. Un conjugado de un péptido vehículo de penetración celular y un principio activo,
 en el que el péptido vehículo es un péptido que consiste en al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6 o un péptido que tiene al menos un 80 % de homología con al menos una de SEQ ID NO: 1-6,
 5 en el que el péptido que tiene al menos un 80 % de homología retiene la capacidad de penetración celular de una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6 y en el que dicho conjugado es capaz de administrar el principio activo en una célula.
2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido vehículo consiste en una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6.
- 10 3. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el principio activo es
 - a) al menos uno seleccionado de una proteína, un ácido nucleico, un péptido, un lípido, un lípido de glicol, un mineral, un azúcar, una nanopartícula, un producto biológico, un agente de contraste, un fármaco y un compuesto químico; o
 - 15 b) una proteína o un péptido, opcionalmente una citocina, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una enzima terapéutica, un receptor soluble o un ligando.
4. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el péptido vehículo y el principio activo están
 - a) conjugados a través de un enlace covalente, opcionalmente mediado por un enlazador; o
 - b) conjugados a través de un enlace no covalente.
- 20 5. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el péptido vehículo se combina con isotiocianato de fluoresceína o Proteína Fluorescente Verde (GFP).
6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el principio activo es un agente de contraste.
7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste en un agente de contraste radioopaco, un agente de contraste paramagnético, un agente de contraste superparamagnético y un agente de contraste CT.
- 25 8. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente de contraste se basa en hierro, opcionalmente un carboxilato de ferroceno.
9. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso en el contraste de una célula, opcionalmente una célula madre.
- 30 10. Una composición que comprende el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la reivindicación 8, que es una composición farmacéutica, una composición cosmética o una composición de alimentos saludables.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que es para el tratamiento o la prevención de una enfermedad.
- 35 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, para el tratamiento o la prevención de un cáncer, un trastorno inmunitario o una enfermedad asociada a un mal funcionamiento de los fibroblastos.
13. Un procedimiento para administrar un principio activo en una célula, opcionalmente en mitocondrias, que comprende administrar el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 a una célula *in vitro*,
 40 en el que el péptido vehículo es un péptido de penetración celular que logra la administración del principio activo en la célula.
14. Un péptido vehículo de penetración celular, en el que el péptido vehículo es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 y 6 o un péptido que tiene al menos un 80 % de homología con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 y 6.
- 45 15. Un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 14.
16. Una célula transformada que comprende un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15.

[FIG. 1]

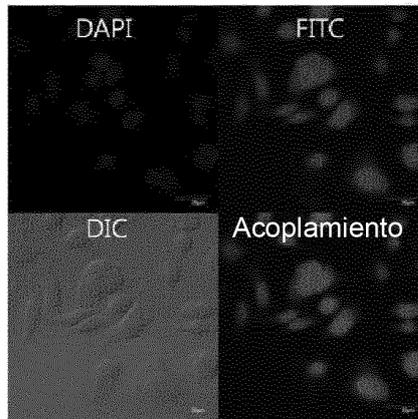


[FIG. 2]

[Pep73 - FITC]

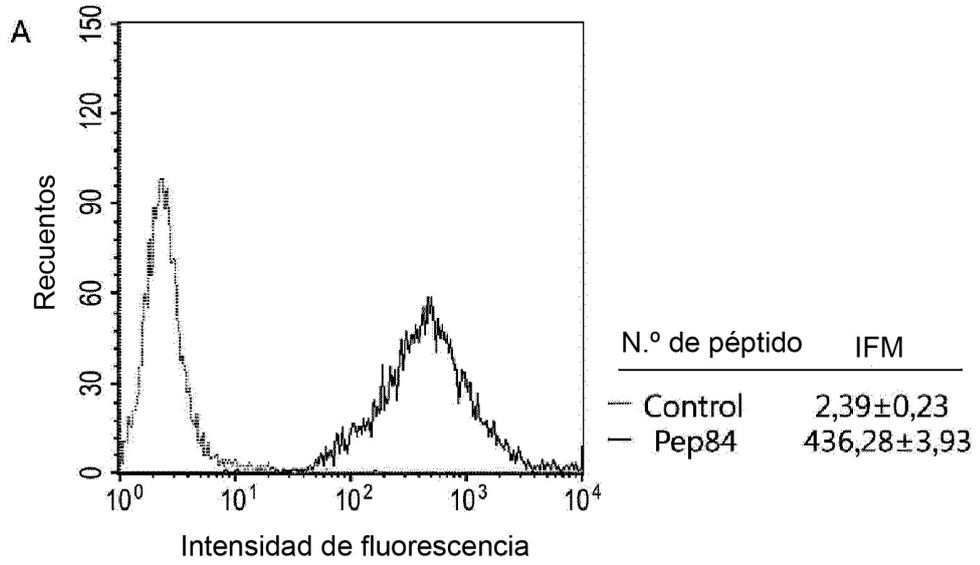


B

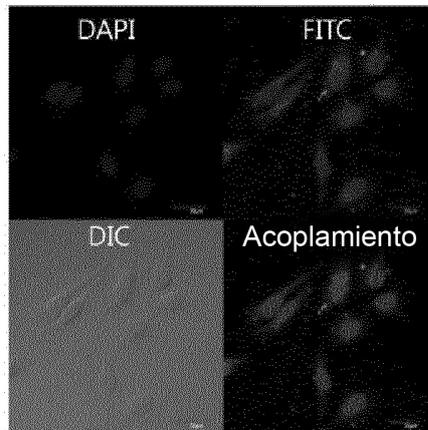


[FIG. 3]

[Pep84 - FITC]

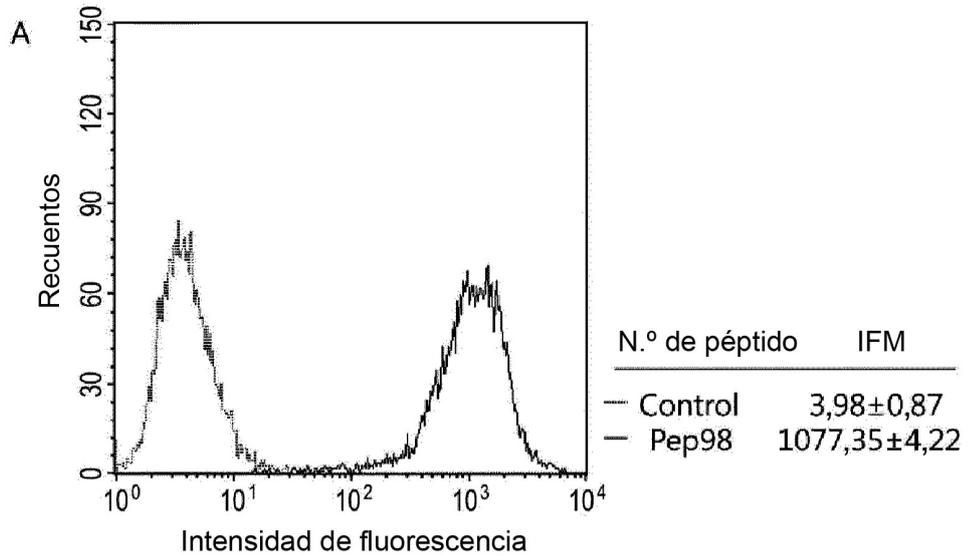


B

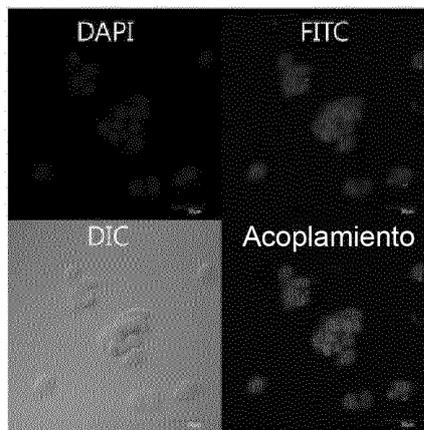


[FIG. 4]

[Pep98 - FITC]

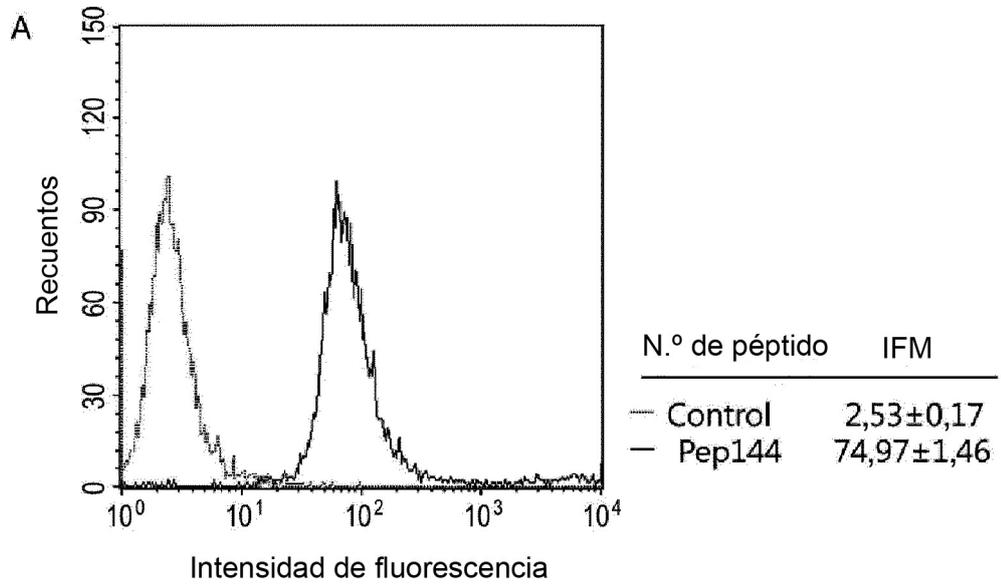


B



[FIG. 5]

[Pep144 - FITC]



B

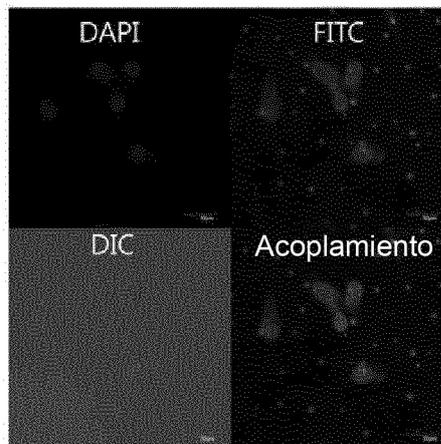
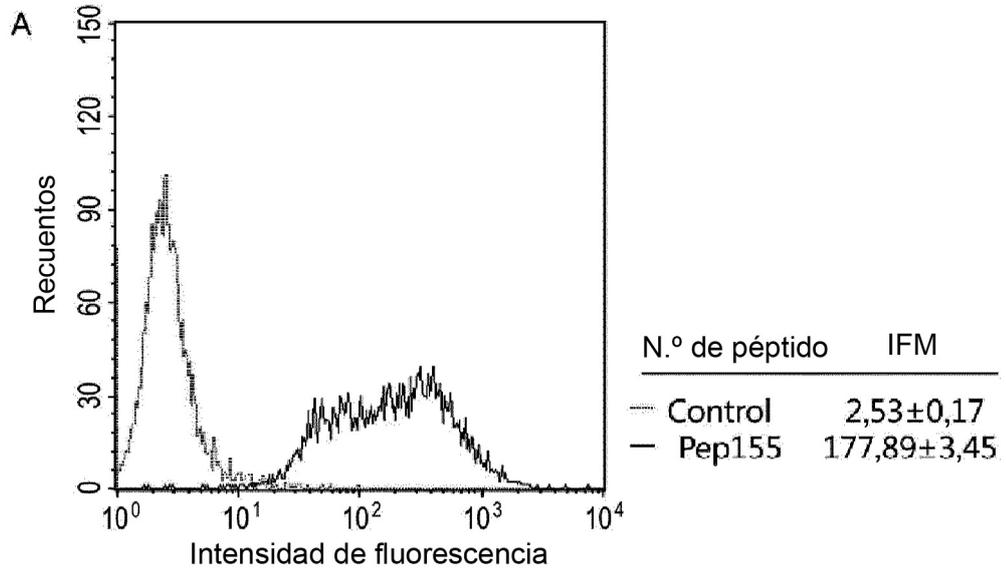
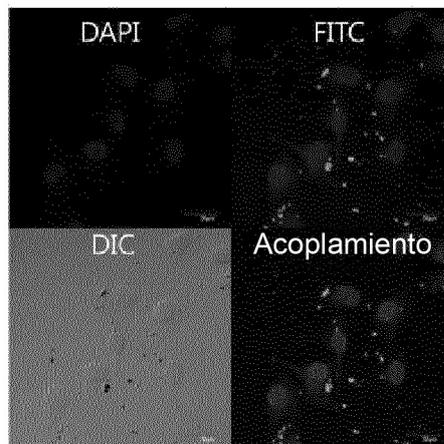


FIG. 6]

[Pep155 - FITC]

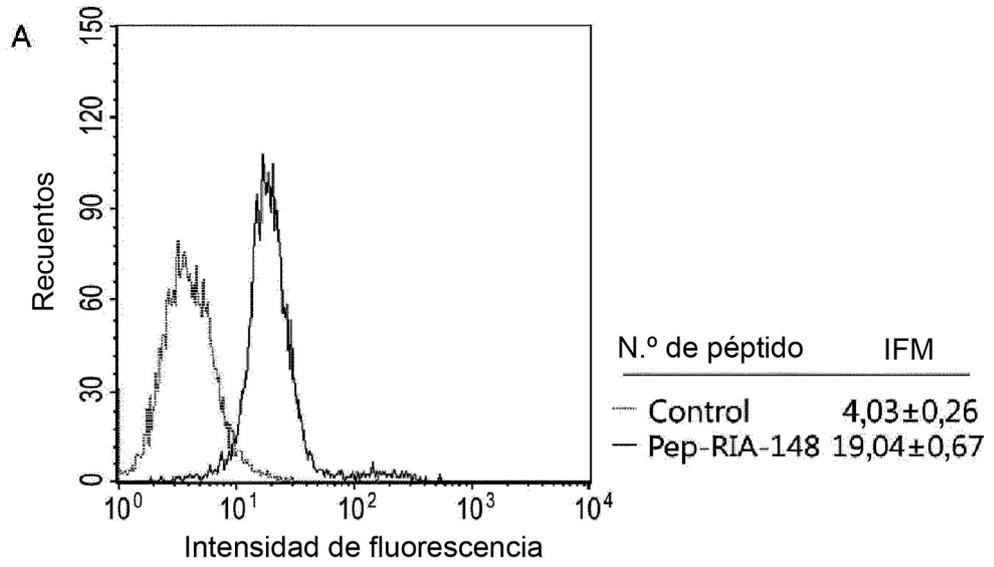


B

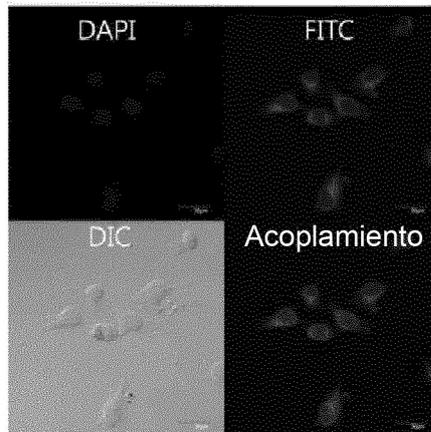


[FIG. 7]

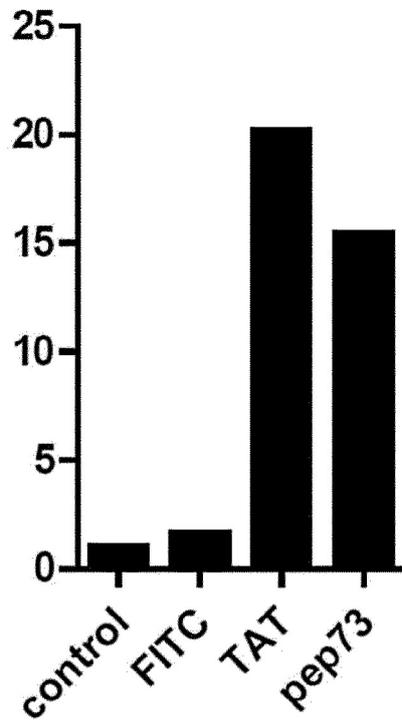
[Pep-RIA-148 - FITC]



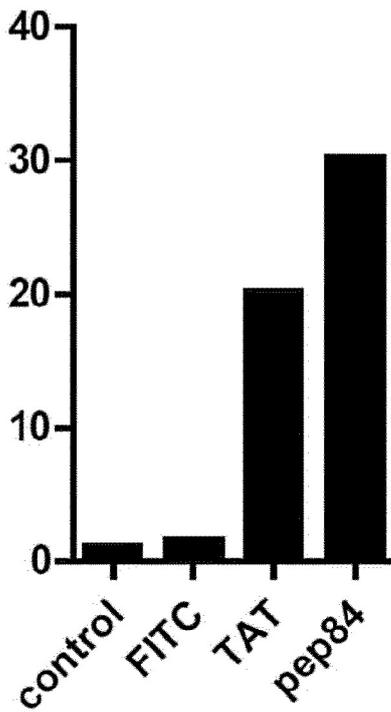
B



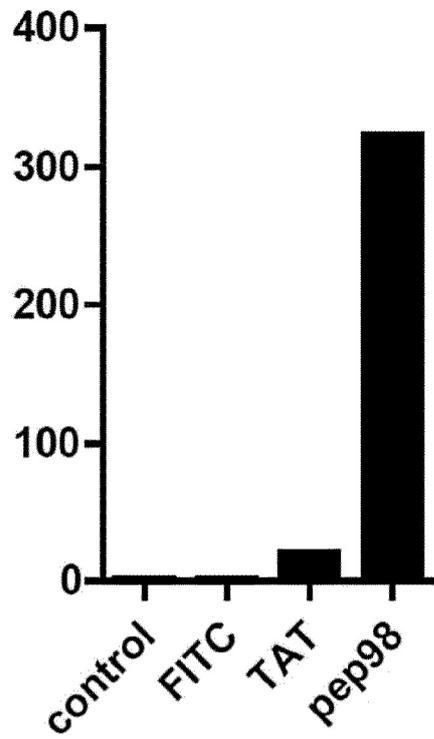
[FIG. 8]



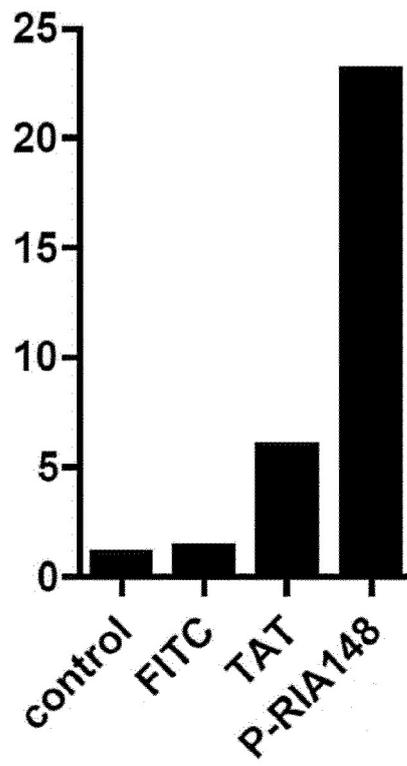
[FIG. 9]



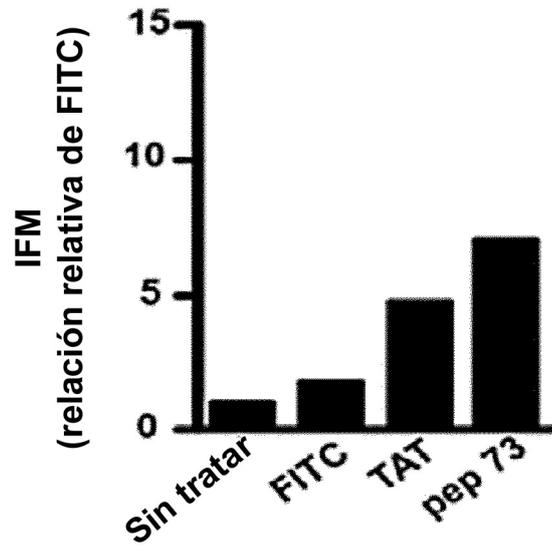
[FIG. 10]



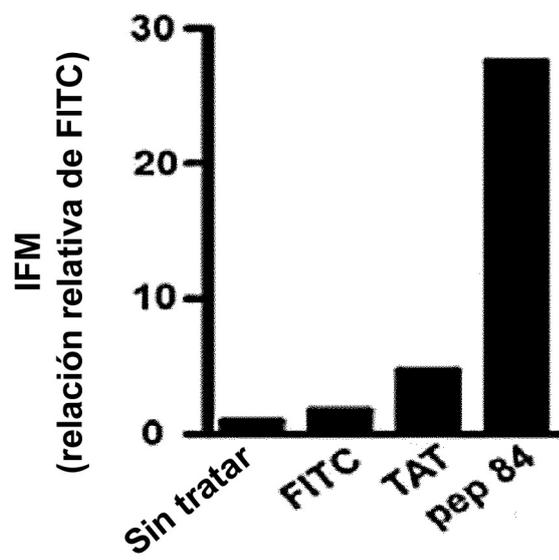
[FIG. 11]



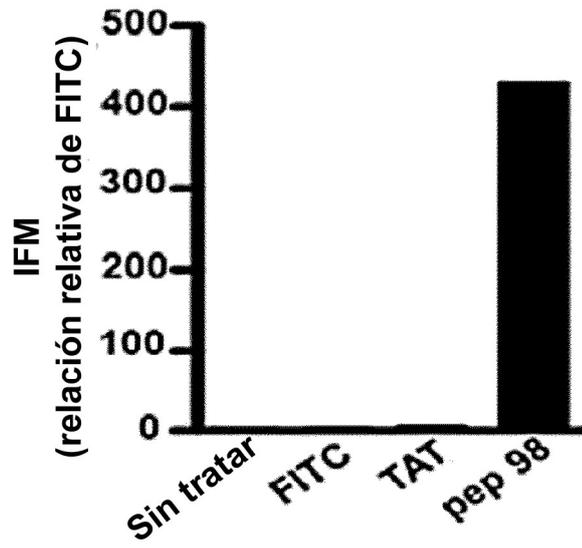
[FIG. 12]



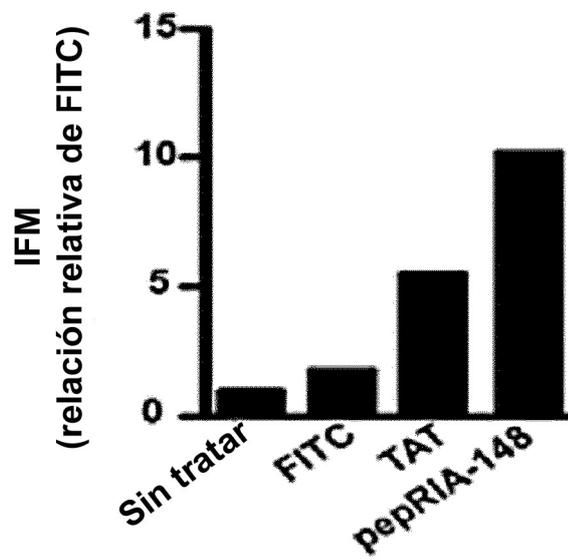
[FIG. 13]



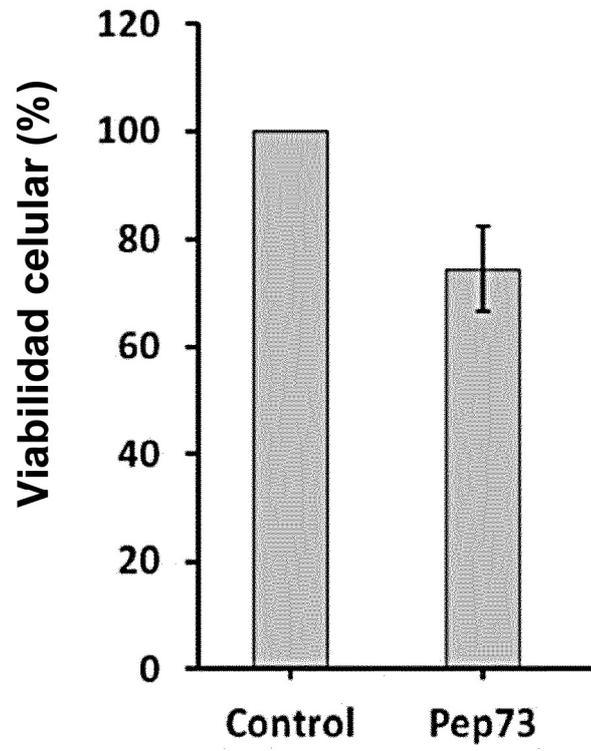
[FIG. 14]



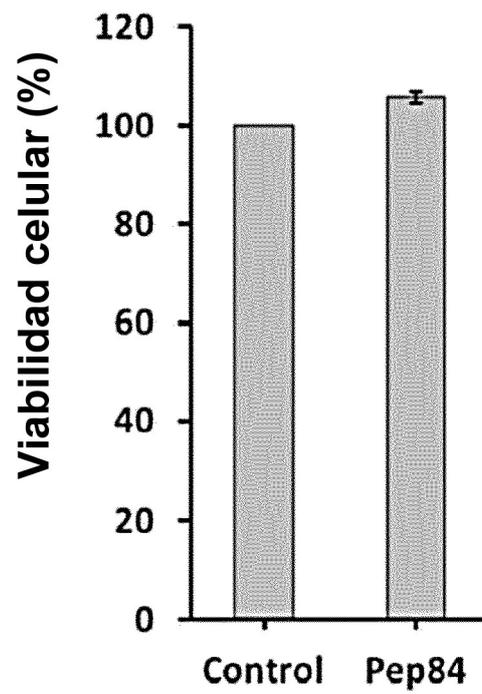
[FIG. 15]



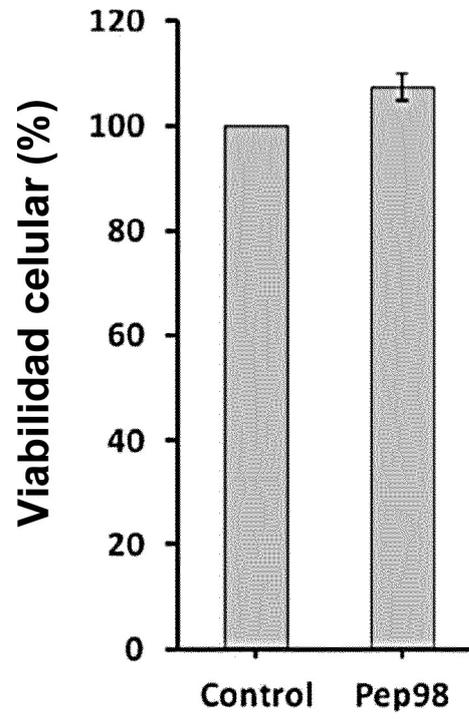
[FIG. 16]



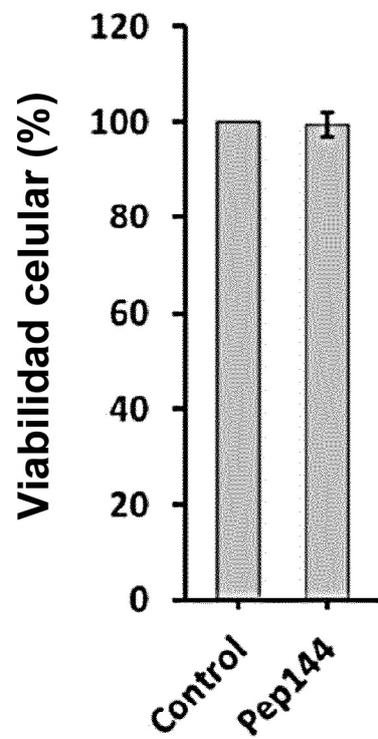
[FIG. 17]



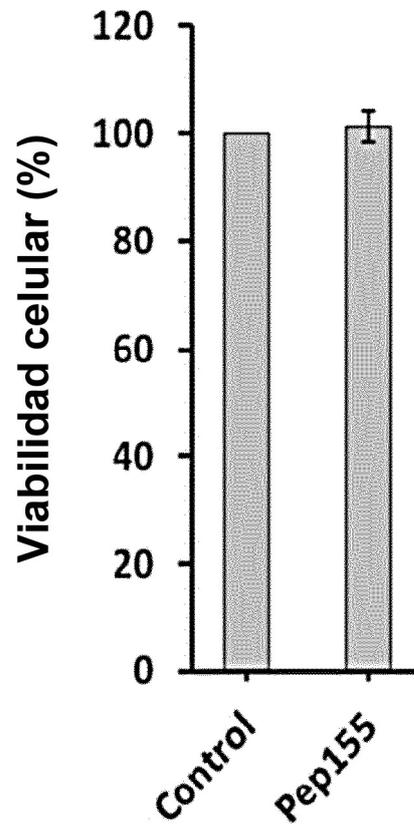
[FIG. 18]



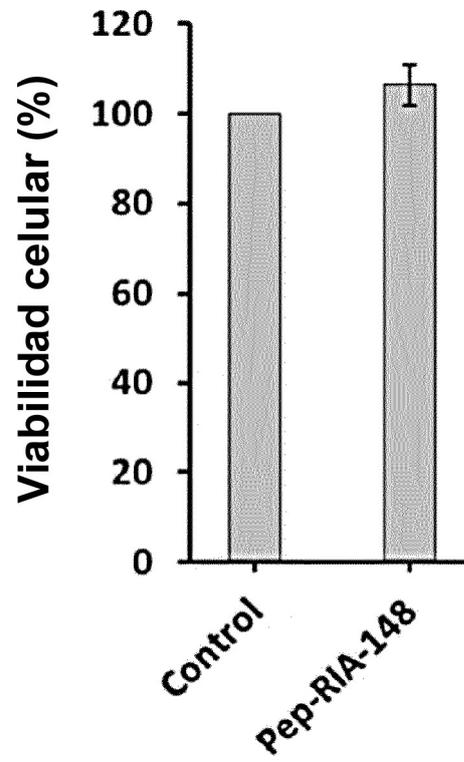
[FIG. 19]



[FIG. 20]

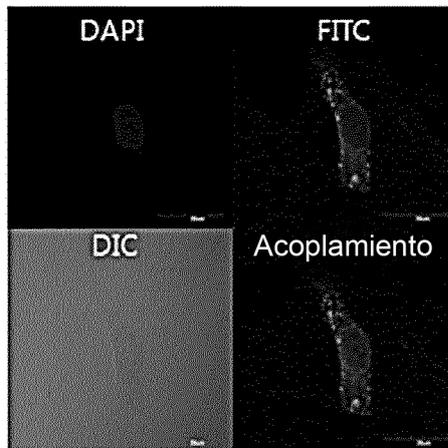
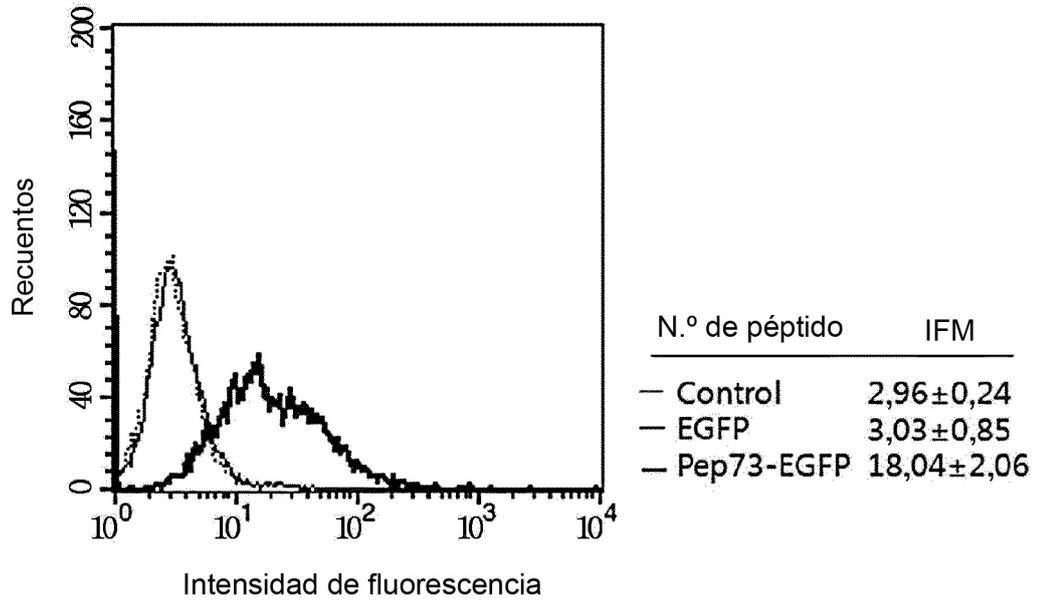


[FIG. 21]



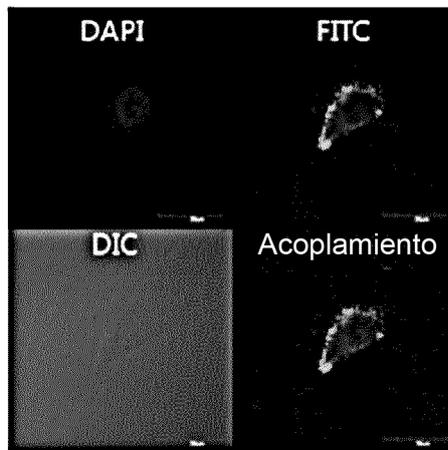
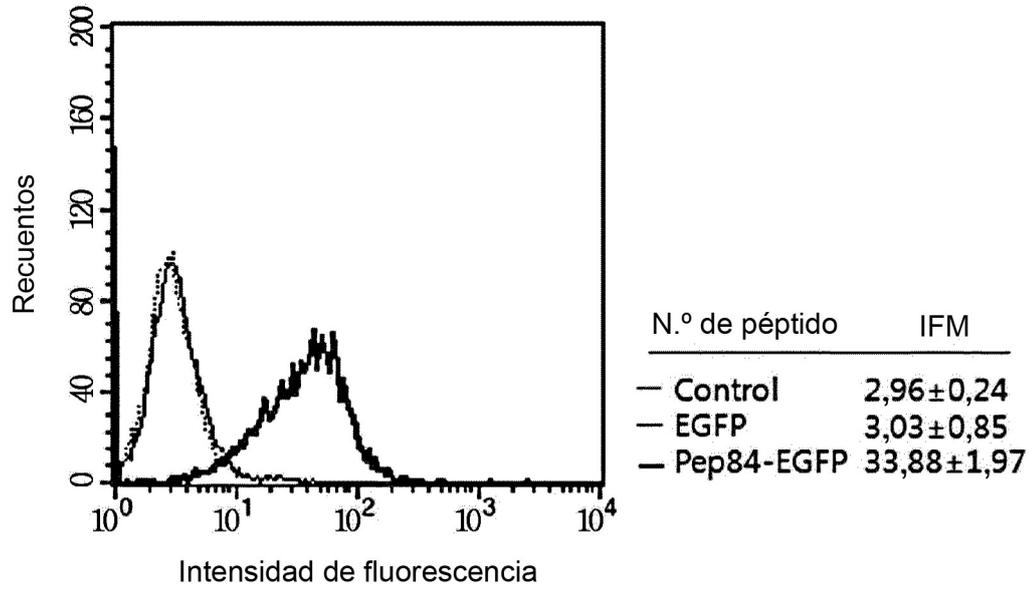
[FIG. 22]

[Pep73-EGFP]



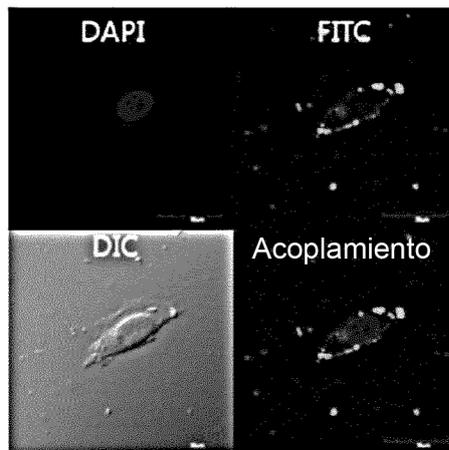
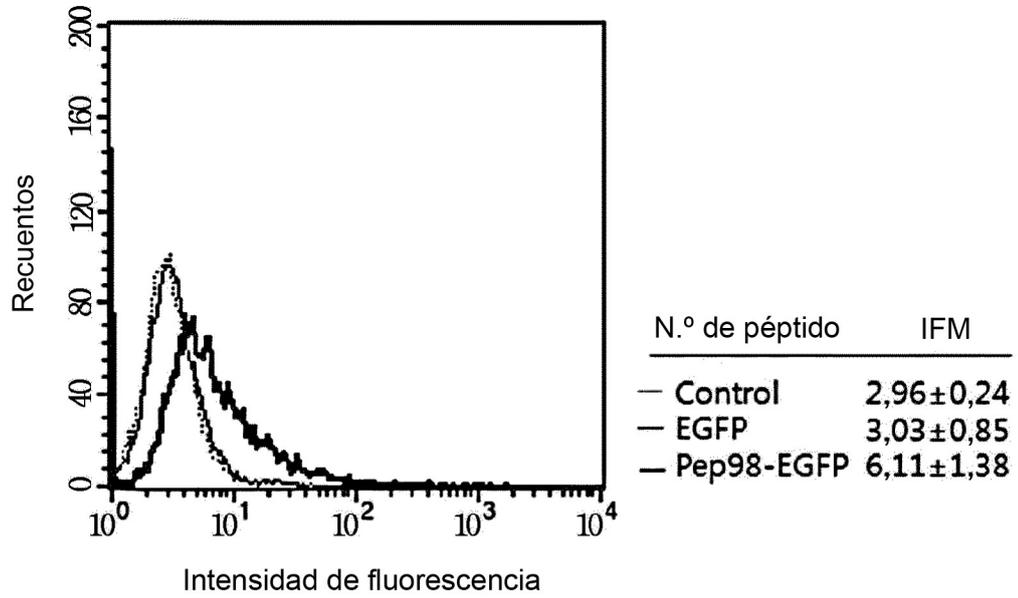
[FIG. 23]

[Pep84-EGFP]



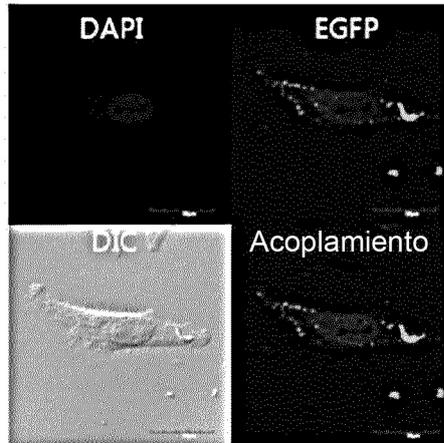
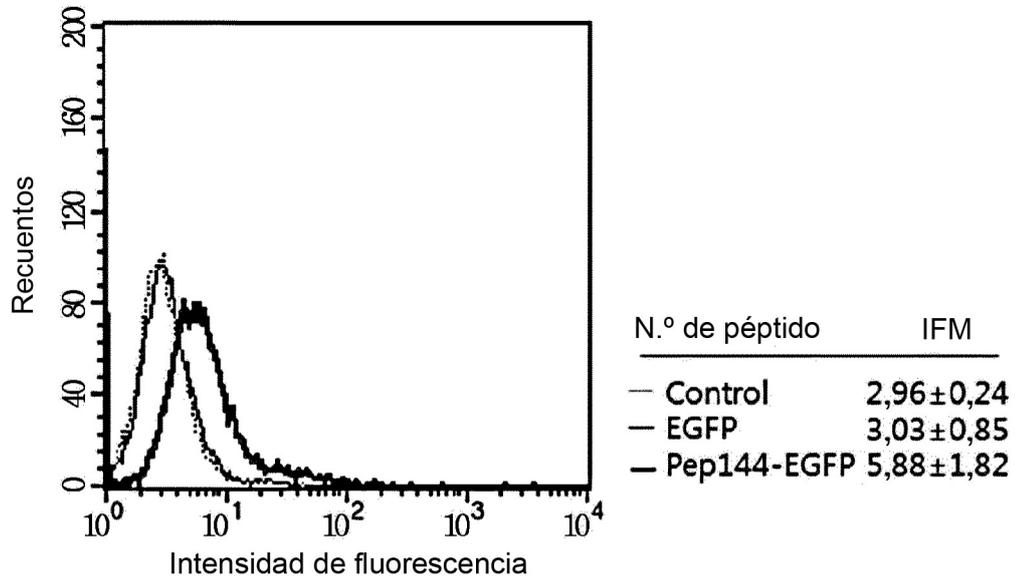
[FIG. 24]

[Pep98-EGFP]



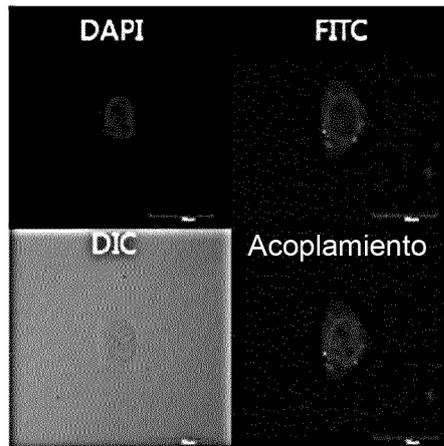
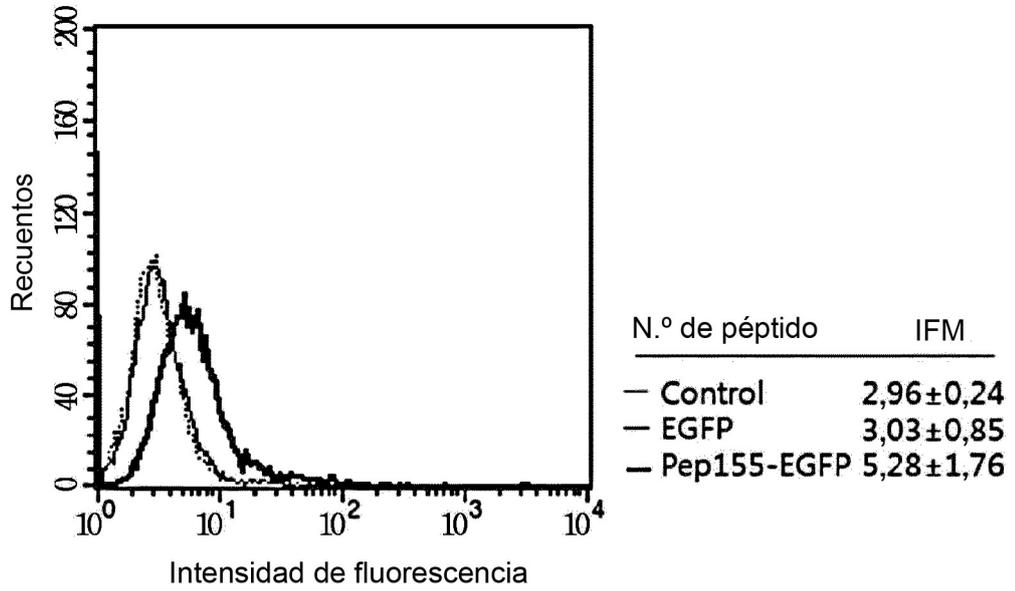
[FIG. 25]

[Pep144-EGFP]



[FIG. 26]

[Pep155-EGFP]



[FIG. 27]

[Pep-RIA-148-EGFP]

